

Analysen zum Chimerismus speziell der Megakaryopoese nach allogener
Knochenmarkstransplantation bei Patienten mit
chronischer myeloischer Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Christine Schneider
geb. am 07.09.1976 in Hamburg

angefertigt im Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln

Betreuer: Prof.Dr.med.Claudia Wickenhauser
Leiterin der Sektion Hämatopathologie
Universitätsklinikum Leipzig – AöR
Department für Diagnostik
Institut für Pathologie
Liebigstr. 26
04103 Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 17.07.2012

Bibliographische Beschreibung

Schneider, Christine

Analysen zum Chimerismus speziell der Megakaryopoese nach allogener Knochenmarkstransplantation bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie

Universität Leipzig, Dissertation

52 Seiten, 123 Literaturangaben, 7 Abbildungen, 8 Tabellen

Referat

Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung des gemischten Chimerismus der Megakaryopoese im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie vor und nach allogener gegengeschlechtlicher Knochenmarkstransplantation. Dazu wurden Knochenmarkbiopsien von acht Patienten aus einem Zeitraum von 9 Jahren untersucht. Pro Probanden standen jeweils eine Biopsie vor und mehrere Biopsien nach KMT zur Verfügung. Mittels sequentieller Immunophänotypisierung und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgte die Analyse des gemischten Chimerismus der Megakaryozyten. Ein besonderes Augenmerk lag auf der Dynamik und Unterschieden des gemischten Chimerismus in den Situationen des erfolgreichen Engraftments, rezidivfreien Überlebens und des leukämischen Rezidivs. Bei erfolgreichem Engraftment kommt es zu einem Überwiegen der Spenderzellen. In der frühen und späten Posttransplantatperiode kann eine Umkehr des gemischten Chimerismus im Rahmen des leukämischen Rezidivs beobachtet werden. Diese Veränderung der Spenderzellen zu einem Hauptauftreten der Empfängerzellen kann als Konversionsphänomen als ein wichtiger Frühindikator für ein drohendes Rezidiv aufgefasst werden und korreliert mit der Beobachtung eines Wiederauftretens zytologischer Atypien in dieser Zellreihe.

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

CFU-Meg	colony forming units megakaryopoiesis
CHR	complete hematological response
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CNL	chronische Neutrophilenleukämie
CyA	Ciclosporin A
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	essentielle Thrombozythämie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein
GP IIIa	Glykoprotein IIIa
GvHK	Graft-versus-Host-Erkrankung
GvLR	Graft-versus-Leukämie-Reaktion
HLA	Human leukocyte antigen
KMT	Knochenmarkstransplantation
LDH	Lactatdehydrogenase
MK	Megakaryozyten
MKB	Megakaryoblast
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MRD	minimal residual disease
MTX	Methotrexat
PBSCT	Zytokin mobilisierte periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGC	Progenitor cells
Ph-Chromosom	Philadelphia – Chromosom
PMF	primäre Myelofibrose
PMKB	Promegakaryoblasten
PV	Polyzythämia vera
SNP	single nucleotid polymorphism
STR	short tandem repeats
SZT	Stammzelltransplantation
TBS	Tris Buffered Saline
TK	Thrombozytenkonzentrate

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myeloproliferative Neoplasien	1
1.2	Klinik, Verlauf und Therapieansätze der CML	2
1.3	Die Megakaryopoese im Knochenmark	5
1.3.1	Reifungsprozesse der Megakaryopoese	5
1.3.2	Der Promegakaryoblast	6
1.3.3	Der Megakaryoblast	7
1.3.4	Der Promegakaryozyt	7
1.3.5	Der granuläre Megakaryozyt	7
1.3.6	Der Megakaryozyt	7
1.4	Die Megakaryopoese bei der CML	8
1.5	Hämatopoetische Rekonstruktion nach KMT	8
1.6	Allgemeine Übersicht über den linienspezifischen Chimerismus im Knochenmark	9
1.7	Fragestellung der Arbeit	11
2	Material und Methode	13
2.1	Klinische Daten	13
2.2	CD 61 – Immunhistochemie	14
2.2.1	Charakterisierung des Antikörpers Y2/51 (CD61)	14
2.2.2	Immunhistochemische Charakterisierung der Megakaryozyten und ihrer Vorläuferzellen	15
2.3	Fluoreszenz – in - situ – Hybridization (FISH – Technik)	16
2.3	Auswertung und Differenzierung von den Wirts – und Spendermegakaryozyten	17
3	Ergebnisse	20
3.1	Allgemeine Übersicht über die Ergebnisse	20
3.2	Allgemeine Übersicht über die Quantifizierung der Wirts- und Spenderzellen	20
3.2.1	Erfolgreich transplantierte Patienten	21
3.2.2	Leukämisches Rezidiv	22
3.3	Erfolgreiches Engraftment in der Posttransplantatperiode	23

3.4	Leukämisches Rezidiv in der Posttransplantatperiode	26
4	Diskussion	29
4.1	Kritische Anmerkungen zur Methodik	29
4.2	Diskussion der Ergebnisse	30
4.3	Vergleich mit dem Chimerismus der T – und B – Lymphozyten	32
4.4	Vergleich mit dem Chimerismus der CD34+-Vorläuferzellen und den Makrophagen als Repräsentanten der myeloiden Reihe	33
4.5	Besonderheiten bei der Auswertung der Megakaryozyten im Vergleich zu den anderen myeloischen Zellelementen	34
5	Zusammenfassung	36
6	Literaturverzeichnis	38
7	Danksagung	52
8	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	53
9	Lebenslauf	54

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) sind mit einer Inzidenz von etwa 2,5 pro 100.000 Einwohner in ihrer Häufigkeit mit den malignen Non – Hodgkin – Lymphomen zu vergleichen. Bezogen auf die Gesamtheit der Malignome sind sie daher als relativ seltene Entitäten anzusehen. (23,73,74) Neben der Philadelphia – Chromosom – positiven (Ph^+) chronischen myeloischen Leukämie (CML) zählen auch die Ph^- - Entitäten der Polycythämia vera (PV), die primäre Myelofibrose (PMF) und die essentielle Thrombozythämie (ET) dazu. Mit einer relativen Häufigkeit von 50 – 60% steht die CML an der Spitze der MPN, die ET ist mit weniger als 10% der seltenste Subtyp. Bei ähnlicher Histomorphologie ist von der bcr-abl positiven CML insbesondere auch auch die sehr viel seltenere Philadelphia – Chromosom - negative chronische Neutrophilenleukämie (CNL) oder auch eine leukämoide Knochenmarksreaktion bei entzündlich / infektiösem Grundleiden abzugrenzen. (37,50,141).

Bei hohem Gehalt an Eosinophilen kann ferner die Differentialdiagnose einer chronischen eosinophilen Leukämie problematisch sein. Auch hier hilft eine molekularpathologische weitere Aufarbeitung (7,134).

Als Gemeinsamkeit der MPN liegt eine klonale Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle bei lückenloser Ausreifung der Zellreihen mit Entwicklung einer neoplastischen Hämatopoese vor. In der Folge kann das Verhältnis der einzelnen Zellreihen zueinander unterschiedlich ausfallen. Im späteren Verlauf der Erkrankung entsteht bei einem Teil der Patienten eine Myelofibrose mit konsekutiver Markinsuffizienz und metastatischer Blutbildung z.B. in der Milz (30,41,114). Die Erkrankungen verlaufen, mit Ausnahme der ET, über eine „präleukämische Phase“ in eine chronische stabile Phase. In einem nicht unerheblichen Prozentsatz schließt sich hieran eine blastäre (instabile) Phase an. Insbesondere für die CML ist dieser terminale Blastenschub die Regel (31,95). Für die übrigen Subtypen der MPN ist ein ähnlicher Verlauf bzw. die Entwicklung einer sekundären AML in unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit ebenfalls gegeben. Das Stadium der Erkrankung einer MPN wird im wesentlichen

durch die hämatologisch – klinischen Befunde, die zytogenetischen Befunde und durch die Morphologie des Knochenmarks bestimmt (31,41,114).

1.2 Klinik, Verlauf und Therapieansätze der CML

Die CML macht etwa 20% aller Leukämien aus und tritt überwiegend bei Patienten im mittleren bis höheren Lebensalter auf. Bei Diagnosestellung sind die Erkrankten im Mittel zwischen 50 und 60 Jahre alt, 10% sind zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 20 Jahre alt. Pro Jahr erkranken durchschnittlich 1,6 von 100000 Erwachsenen neu an der CML, wobei Frauen seltener betroffen sind als Männer. Die Inzidenz ist weltweit weitestgehend ähnlich ohne regionale oder ethnische Unterschiede. Als mögliche Risikofaktoren wird eine erhöhte Belastung durch Strahlen oder Benzol diskutiert.

Die Erkrankung ist durch eine konstante genomische Aberration mit Ausbildung eines BCR – ABL Fusionsgens charakterisiert, die in allen drei hämatologischen Zellreihen zu identifizieren ist (95). Diese Chromosomentranslokation zeigt sich zytogenetisch als verkürztes Chromosom 22, dem sogenannten Philadelphia - Chromosom.

Das ABL – Gen kodiert für eine Tyrosinkinase und spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Wachstumsregulation. Bei einem Vorliegen des BCR – ABL Fusionsgens kommt es zu einer Daueraktivierung der Tyrosinkinase und daraus resultierend zu einer unkontrollierten Zellproliferation der myeloiden Vorläuferzellen in all ihren Entwicklungsstadien und deren vorzeitige Abgabe in die Blutbahn (46).

Die CML wird klassischerweise in drei Phasen aufgegliedert. Sie beginnt mit der chronischen stabilen Phase, in der die überwiegende Anzahl der Patienten erkannt wird. Diese Phase zeichnet sich durch einen schleichenden Beginn mit auffallender Müdigkeit und Abgeschlagenheit aus, kann aber durchaus über Jahre andauern ohne in die nächste Phase überzugehen. Klinisch kann zu diesem Zeitpunkt bereits eine Splenomegalie bestehen. Durch die zunehmende Verdrängung der gesunden Blutbildung aus dem Knochenmark ist dies ein Zeichen für die vermehrte extramedulläre Blutbildung. Ohne Behandlung droht die Entwicklung einer Akzelerationsphase mit Einmünden in eine Blastenkrise (35,94).

Die allogene Knochenmark – oder Stammzelltransplantation (KMT, SZT) ist bis heute die einzige primär kurative Therapieoption. Die Prognose dieser Therapie ist dabei am günstigsten, je früher im Verlauf der CML sie erfolgt. Ein großes Problem dieser Behandlungsmethode stellt die hohe Komplikationsrate und das damit einhergehende Risiko für das Überleben der Patienten dar, so dass heutzutage die Indikation zur KMT sehr streng gestellt werden muß (63).

Als grundsätzliche Komplikationen sind hier das primäre Transplantatversagen, die therapieinduzierte Mortalität und das Rezidiv zu nennen. Eine wichtige therapieassoziierte Komplikation ist dabei die Graft – versus – Host – Erkrankung (GvHK). Die akute GvHK kommt dadurch zustande, dass das Spenderimmunsystem den Empfängerorganismus als fremd identifiziert. Das Spenderknochenmark produziert alloreaktive T – Zellen, die besonders immunogene Strukturen des Empfängers wie z.B. die Haut, den Gastrointestinaltrakt und die Leber infiltrieren und im Extremfall destruieren. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, muß vor einer allogenen KMT eine hochdosierte myeloablative Chemotherapie erfolgen, um so das körpereigene Immunsystem möglichst vollständig zu zerstören und eine ganzheitliche Einnistung der Spenderzellen zu erreichen.

Eine wichtige Rolle bei der Elimination der Tumorzellen kommt der Graft – versus – Leukemia (GvL) Reaktion zu. Hierbei richten sich die Immunzellen des Spenders gegen die verbliebenen malignen körpereigenen Tumorzellen und tragen so maßgeblich zum Erfolg der SZT bei.

Ziel der Therapie der CML ist ein möglichst weitgehendes Zurückdrängen der Erkrankung bei vertretbaren Nebenwirkungen. Um die Effektivität der Behandlung zu überprüfen, werden sowohl hämatologische als auch zytogenetische und molekulare Kontrollen zu Rate gezogen. Ein vollständiges hämatologisches Ansprechen (CHR) orientiert sich am Grad der Normalisierung des Blutbildes sowie dem Rückgang der klinischen Symptome wie der Splenomegalie. Das zytogenetische Ansprechen wird durch den Nachweis des Philadelphia – Chromosoms überwacht. Standard im Rahmen des Monitorings ist jedoch inzwischen die molekulare Kontrolle, die mittels quantitativer Polymerase – Kettenreaktion (PCR) durch die Messung der BCR – ABL – mRNA erfolgt.

In den letzten Jahren hat sich eine Dauertherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib als Goldstandard der CML – Behandlung durchgesetzt. Der Wirkstoff

hemmt kompetitiv die ABL – Tyrosinkinase, wodurch die unkontrollierte Proliferation der malignen Zellen gestoppt wird. So wird die Apoptose der Zelle induziert und es kommt zur Normalisierung des Blutbildes. Unter Therapie mit Imatinib ist eine langandauernde, vollständige klinische Remission der Erkrankung die Regel. In wieweit diese Therapie alleine bei einem Teil der Patienten zu einer dauerhaften molekularen Remission führen kann, ist jedoch derzeit noch Stand der Diskussion (63,96.).

Ein entscheidender Vorteil dieses Therapieansatzes ist die extrem gute Verträglichkeit. So kommt es nur selten zu Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Hautausschlag oder Ödemen. Im Rahmen der IRIS – Studie zeigte sich nach einem Beobachtungszeitraum von 60 Monaten ein komplettes zytogenetisches Ansprechen von 89% sowie ein CHR von > 80%. In diesem Beobachtungszeitraum wurden so gut wie keine Nebenwirkungen und daraus resultierende Komplikationen beschrieben (32).

In seltenen Fällen kann es zu einer Imatinib Resistenz kommen. Hier muss zwischen einer primären und einer sekundären Resistenz unterschieden werden. Die primäre Resistenz bezeichnet die Situation, in der Patienten von vornherein nicht auf das Medikament ansprechen oder direkt Unverträglichkeiten aufweisen, die die weitere Einnahme unmöglich machen. Die sekundäre Resistenz kann sich zu jedem Zeitpunkt während der Therapie einstellen und so zu einem raschen Fortschreiten der Erkrankung führen. Beiden Arten der Resistenz liegt eine Mutation des BCR – ABL –Fusionsgens zugrunde, so dass der Wirkstoff keinen passenden Angriffspunkt mehr zur Verfügung hat. Inzwischen sind zahlreiche Mutationen identifiziert und charakterisiert worden. Ein anderer Mechanismus, der ebenfalls zu einer Resistenz führen kann, ist die Vervielfältigung der BCR – ABL – produzierten Proteine. Hierbei übersteigt die Anzahl der translatierten Proteine die maximale Hemmfähigkeit von Imatinib (96).

Sollte eine Imatinib Resistenz vorliegen, stehen mehrere Weiterbehandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Der erste Versuch ist eine Dosiserhöhung von Imatinib. Daneben stehen Medikamente der 2. Generation der Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Nilotinib oder Dasatinib zur Verfügung (1,54,106). Sie besitzen im Gegensatz zu Imatinib ein breiteres Wirkspektrum bei gleicher geringer Quote möglicher Nebenwirkungen.

Bei Therapieresistenz für Tyrosinkinase Inhibitoren der 1. und 2. Generation, Transplantationsfähigkeit des Patienten und Verfügbarkeit eines geeigneten Spenders bleibt die SZT die einzige mittelfristige Therapieoption. (54,63,96,106).

1.3 Die Megakaryopoese im Knochenmark

1.3.1 Reifungsprozesse der Megakaryopoese

Die Megakaryopoese repräsentiert einen wesentlichen Differenzierungsweg, den hämatopoetische Stammzellen einschlagen können. Sie lässt sich grundsätzlich in vier wesentliche Entwicklungsschritte einteilen (69):

1. Determinierung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle zur megakaryozytären Vorläuferzelle
2. Reifung der Vorläuferzelle durch Mitose
3. Polyploidisierung durch Endoreduplikation
4. Ausreifung des Zytoplasmas, Synthese der Plättchenproteine und Abschnürung der Thrombozyten

Die Megakaryozyten (MK) stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Die Summe der auslösenden Stimuli, die eine solche Zelle veranlassen, sich in eine megakaryozytäre Stammzelle zu differenzieren, ist bisher noch nicht bekannt. Das geforderte vielgestaltige Leistungsvermögen dieser Stammzellen bringt das Fehlen einer charakteristischen Morphologie und spezifischer Zellmarker mit sich. Die erste Entwicklungsstufe der Megakaryopoese stellen *in vitro* die sogenannten koloniebildenden Einheiten colony forming units – megakaryopoiesis (CFU-M oder CFU-Meg) dar (59,70,74,87,124,125,127). Die Kolonien enthalten mindestens drei, im Durchschnitt 20-50 Vorläuferzellen (70,73). Sie sind kompakt zueinander angeordnet, weisen einen Durchmesser von 10-14 µm auf und besitzen einen runden, ovalen oder eingekerbten Kern bei hoher Kern-Plasma-Relation (59). Die Häufigkeit derartiger megakaryopoietischer Vorläuferzellen *in vivo* wird mit Werten zwischen $0,2/10^4$ und $40/10^4$ Knochenmarkzellen angegeben (22,59,73,81,124).

Im Rahmen der megakaryozytären Differenzierung verlieren die Vorläuferzellen zunehmend an Proliferationskapazität und die *in vitro* gebildeten Kolonien werden kleiner. Mit zunehmender Teilungsunfähigkeit erwerben die Zellen die Fähigkeit

zur Endoreduplikation von DNS. Dieses Phänomen ist ausschließlich in der megakaryozytären Zellreihe zu beobachten.

Aus den CFU-Meg gehen die sukzessive in Zwischenstadien der Differenzierung befindlichen Zellen, die megakaryozytären Vorläuferzellen, bis hin zum reifen Megakaryozyten hervor. Die Promegakaryoblasten (PMKB) erscheinen am 5.-6. Tag in in-vitro Kulturen und bilden damit die erste immunohistochemisch identifizierbare Entwicklungsstufe der Megakaryopoese. In diesem Stadium der Differenzierung erfolgt die Synthese von spezifischen Plättchenproteinen, die durch oben genannte Methoden nachweisbar sind (21,85).

Aus den PMKB entwickeln sich im weiteren Verlauf des Reifungsprozesses nun folgende Zellen: der Megakaryoblast (MKB) (Stadium I), der Promegakaryozyt (Stadium II), der granuläre Megakaryozyt (Stadium III) und der plättchenproduzierende Megakaryozyt (Stadium IV). Alle diese Zellformen der Megakaryopoese können mit Hilfe von zytologischen und immunohistochemischen Verfahren differenziert werden. Den Abschluss dieser Zellreihe bildet der nackte oder pyknotische Kern, welcher den Restzustand der Megakaryozyten darstellt (39,61,124). Diese Zellen lassen sich durch Unterschiede in der Kern – Plasma – Relation, Kernkonfiguration und Größe gegeneinander abgrenzen (124).

1.3.2 Der Promegakaryoblast

Die PMKB zeichnen sich durch einen runden, nicht eingekerbten Zellkern, eine hohe Kern-Plasma-Relation, einen schmalen basophilen Zytoplasmasaum und fehlende Plättchenorganellen aus (22,69,84,117). Damit sind sie lymphoiden Zellen und auch Normoblasten zum Verwechseln ähnlich, so dass routinemäßige Darstellungsmethoden zur endgültigen Differenzierung nicht ausreichen. Durch den Nachweis von CD61, einem Glykoprotein, ist die Erkennung der PMKB in Paraffin eingebettetem Knochenmarkmaterial möglich. Somit stellt der PMKB die früheste Form der megakaryozytären Zellreihe dar, die immunhistochemisch identifizierbar ist (22,47,69).

In histologischen Gewebsschnitten kommt dem PMKB ein Anteil von 6-8% der Megakaryopoese zu teil (117) entsprechend einer Häufigkeit von 1,7 Zellen/mm² Knochenmark. In Knochenmarkausstrichen ist ihre Häufigkeit mit 0,8-2,9/10⁴ der

kernhaltigen Zellen anzugeben. Mikroskopisch stellen sich die PMKB als kleine, mononukleäre Zellen mit einem Durchmesser von 8-14 µm dar.

1.3.3 Der Megakaryoblast

Der Megakaryoblast stellt das Stadium 1 der megakaryozytären Zellreihe dar. Sowohl in Größe als auch in Durchmesser übertreffen die MKB ihre direkten Vorläuferzellen, die PMKB. Mikroskopisch beobachtet man kreisförmige Zellen mit einem kompakten, leicht eingebuchteten Kern, der häufig einen Nukleolus und ein aufgelockertes Chromatinmuster besitzt. Im Vergleich zu den PMKB weisen die MKB mehr basophiles Zytoplasma auf, besitzen aber von allen unreifen Stadien der Megakaryopoese die höchste Kern-Plasma-Relation (114,117).

1.3.4 Der Promegakaryozyt

Die Promegakaryozyten bilden Stadium 2 der Zellentwicklung. Sie zeichnen sich mikroskopisch durch einen hufeisenförmigen Kern aus, der zunehmend segmentiert erscheint. Der Zytoplasmasaum präsentiert sich weniger basophil, die Kern – Zytoplasmarelation ist zugunsten des Zytoplasmas verschoben.

1.3.5 Der granuläre Megakaryozyt

Im Stadium 3 weist der granuläre Megakaryozyt in der mikroskopischen Beobachtung einen mehrfach gelappten Kern und eine leichte Eosinophilie des Zytoplasmas auf (59,81).

1.3.6 Der Megakaryozyt

Der reife Megakaryozyt bildet das Stadium 4 der Zellentwicklung. Er zeigt mikroskopisch einen kompakten, vielfach gelappten Kern, der sich in einem eosinophilen Zytoplasma befindet (59,81). Weiterhin zeichnet sich der Megakaryozyt durch ein Endomembransystem aus, das bei weiterer Ausreifung zur Abschnürung der Thrombozyten führt (Demarkationsmembran) (134). Als Ursprungszelle der Thrombozyten spielt der Megakaryozyt somit eine wichtige Rolle für die Hämostase, obwohl diese Form zahlenmäßig mit einem relativen

Anteil der Knochenmarkszellen von 0,05 – 0,5% nur sehr gering vertreten ist (60,83).

1.4 Die Megakaryopoese bei der CML

Die Megakaryopoese im Rahmen der CML zeichnet sich vor allem durch eine variable Proliferation und Zellvermehrung sowie durch eine charakteristische Zytomorphologie aus (37,107,109). Typischerweise ist das Bild hier durch kleinere, atypische Zellformen, den Mikromegakaryozyten dominiert. Damit stellen diese ein wichtiges morphologisches Charakteristikum der CML dar (107,125,126). Bezüglich der Zellzahl ist festzuhalten, dass nach Literaturberichten unbehandelt eine Korrelation zwischen erhöhter Frequenz und schlechterer Prognose gegeben sein soll (96,116,120). Dies ist vor allem auch durch die enge funktionelle Beziehung zur gesteigerten Markfibrose durch Fibrillogenese zu erklären (17,18).

1.5 Hämatopoetische Rekonstruktion nach KMT

Das Knochenmark bildet die passende Umgebung, damit sich die Vorläuferzellen der Hämatopoese vermehren und differenzieren können, bis sie als ausgereifte Endzellen in den Blutkreislauf abgegeben werden können. Weiterhin stellt das Knochenmark auch ein Reservoir für die Stammzellproduktion dar. Durch die vor der endgültigen Knochenmarkstransplantation notwendige myeloablative Behandlung (Konditionierung) werden möglichst viele Wirtszellen der Hämatopoese des Knochenmarks zerstört, um anschließend durch gesunde Spenderzellen ersetzt werden zu können. Als Engraftment bezeichnet man das erfolgreiche Ansiedeln von Spenderzellen im Knochenmark, das auch einen Effekt auf die langfristige Prognose der Erkrankung hat (56).

Histomorphologisch zeigen sich bei erfolgreichem Engraftment nach KMT primär einzelne Inseln von Regenerationsblasten, im Knochenmark. Dann zeigen sich Inseln einer ausreifenden Hämatopoese, wobei eine reguläre zonale Gliederung der Ausreifungszonen gegeben sein sollte. Nach vier bis sechs Wochen sollte eine normale Zellularität im Knochenmark vorliegen. Bei der qualitativen

Einschätzung des Engraftments wird klinisch auf den Parameter des Zeitpunkts der Transfusionsunabhängigkeit zurückgegriffen. Je eher bei dem Patienten auf die unterstützenden Transfusionen von Plättchen- und Granulozyten verzichtet werden kann, desto besser ist das Engraftment. Es gilt als erfolgreich, wenn diese Unabhängigkeit innerhalb der ersten 30 Tage nach KMT erreicht wird. Alles, was darüber hinausgeht, wird als verzögert bezeichnet. Der histopathologische Befund des Knochenmarks bei der CML hat einen hohen diagnostischen Wert. Anämie, Anteil der Myelo – und Erythroblasten im peripheren Blut, Größe der Milz und der LDH – Spiegel stehen als klinische Marker des Krankheitsstadiums in Korrelation mit der Struktur des Knochenmarks (112). Eine histopathologisch nachgewiesene Verminderung der Megakaryopoese einhergehend mit einer zunehmenden Myelofibrosierung zeigt eine Persistenz des neoplastischen Klon an. Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass eine solch verminderte Megakaryopoese und eine vermehrte Faserbildung bei Patienten weitaus häufiger zu einem verzögerten Engraftment geführt hat (27,58,112).

1.6 Allgemeine Übersicht des linienspezifischen Chimerismus im Knochenmark

Der Begriff des Chimerismus bezeichnet die Existenz von Zellen zweier unterschiedlicher Organismen in einem Körper.

Für die Knochenmarktransplantation bedeutet dies eine Persistenz hämatologischer Empfängerzellen im Spendertransplantat. Der alleinige Nachweis von Knochenmark - Spenderzellen wird kompletter Chimerismus genannt. Zeigt der Patient sowohl Spender – als auch Empfängerzellen, liegt ein gemischter Chimerismus (mixed chimerism) vor. Sind lediglich weniger als 1% der Empfängerzellen auszumachen, spricht man von Mikrochimerismus.

Das Ziel der der KMT vorgeschalteten myeloablativen Therapie in Form einer Radiochemotherapie ist die möglichst vollständige Eliminierung der hämatopoetischen Empfängerzellen. So kann durch die ganzheitliche Einnistung der Spenderzellen ein kompletter Chimerismus erreicht werden, der für ein langanhaltendes Engraftment wichtig ist (104). Zusätzlich spielt für den Erfolg der KMT der Graft – versus – Leukemia – Effekt eine entscheidende Rolle. Je stärker

sich die Spenderzellen gegen die verbliebenen neoplastischen Zellen richten, desto besser sind die Aussichten auf ein erfolgreiches Engraftment.

Trotz myeloablativer Therapie sind im Knochenmark noch einige Empfängerzellen entsprechend einem gemischtem Chimerismus nachzuweisen. Diese Empfängerzellen können, müssen aber nicht leukämischen Ursprungs sein. Wird der leukämische Klon nachgewiesen, klinisch, hämatologisch und zytogenetisch jedoch eine Remission beobachtet, dann liegt eine minimale residuelle Erkrankung (minimal residual disease, MRD) vor (54,79). Ein gemischter Chimerismus ist allerdings häufig kurz nach der Transplantation zu finden, ohne dass dadurch eine eindeutige Prognose für ein Rezidiv der Erkrankung gemacht werden kann. Kleine Mengen von Empfängerzellen nach KMT stellen somit noch keinen konkreten Hinweis auf ein drohendes Rezidiv dar. Besonders bei Patienten, die T-Zell-gereinigtes Knochenmark erhalten haben, kann ein erhöhter Anteil von residualen Empfängerzellen nachgewiesen werden (57,91,96). Sollte diese Residualpopulation des Empfängermarkes fortbestehen, dann kann dieser Anstieg des gemischten Chimerismus als ein Anzeichen für eine erhöhte Gefahr eines erneuten Auftretens der Krankheit gesehen werden (78,79,104,133). Es liegen mehrere Verfahren vor, um einen Chimerismus nachweisen und quantifizieren zu können. Notwendige Vorbedingung ist dabei, Unterschiede zwischen den Empfängerzellen und dem Spendermark zu kennen. Die quantitative PCR mit Nachweis der bcr-abl mRNA stellt im Falle der CML die Standardmethode zur Überwachung einer molekularen Remission dar, mit dieser Methode kann bereits ein Chimerismus $<1\%$ nachgewiesen werden (54,91). Selten kann diese Translokation auch bei Gesunden nachgewiesen werden, so dass hier die Knochenmarkspende ausgeschlossen sein sollte (9). Über den Nachweis von bei Spender und Empfänger unterschiedlich ausgeprägten Nukleotid – Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ist ebenfalls über Amplifikationsverfahren die Quantifizierung von Empfänger – und Empfängerzellen möglich – ohne jedoch eine direkte Quantifizierung der neoplastischen Hämatopoiese zu erlauben. Weiterhin kommt das Verfahren des genetischen Fingerabdrucks zur Anwendung. Durch die individuelle Anordnung von kurzen Tandemwiederholungen (short tandem repeats, STR) in nicht kodierenden DNA Abschnitten ist eine Zuordnung von Spender – und Empfängerzellen ebenfalls möglich – allerdings auf weniger sensitivem Niveau.

Eine primär morphologische Möglichkeit des Nachweises bietet die FISH – Analyse. Mit dieser Methode ist es an zytologischen oder histologischen Präparaten grundsätzlich möglich, das bcr-abl Fusionsgen nachzuweisen. Im Falle einer gegengeschlechtlichen Transplantation kann zytologisch oder am Knochenmarkstrepanat der Anteil der X – und Y – Chromosomen in Interphasekernen bestimmt werden (29). Diese Methode ist äußerst spezifisch bei moderater Sensitivität und hat einen festen Platz im Rahmen histomorphologischer Chimerismusstudien (20). In Kombination mit immunhistochemischen Methoden kann die FISH – Analyse dazu benutzt werden, den gemischten Chimerismus sowohl in Zellen des Blutes als auch in Zellen des Knochenmarks während der Posttransplantatperiode den verschiedenen Zellreihen exakt zuzuordnen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den Patienten, bei denen der Verdacht auf die Entwicklung eines leukämischen Rezidivs besteht (119).

In vorangegangenen Studien konnte bereits die Dynamik des Rezidivprozesses von Lymphozyten, Myelomonozyten, CD34+ Vorläuferzellen und Makrophagen aufgezeigt werden (55,118,133). Weiterhin wurden im Rahmen dieses Prozesses nicht – hämatologische Zellen wie Kardiomyozyten, Endothelzellen und Nephrozyten untersucht (118).

1.7 Fragestellung der Arbeit

- a) Quantifizierung des Chimerismus der Megakaryopoese in der Früh – und Spätphase nach KMT einer CML im Vergleich zu den übrigen hämatologischen Zellreihen

Für die vorliegende Arbeit standen uns historische Knochenmarks - Blockpräparate und anonymisierte Datenarchive von Patienten nach allogener KMT bei einer CML zur Verfügung. Unser Fokus lag dabei darauf, speziell die Megakaryopoese bei der Entwicklung eines gemischten Chimerismus nach allogener KMT zu beobachten. Bei ausschließlicher Analyse von Patienten mit einer gegengeschlechtlichen Transplantation konnte durch die Analyse des Genotyps der Megakaryozyten die Herkunft der Zellen festgestellt werden und so

die residuale Empfängerzellpopulation der Megakaryopoese quantitativ erfasst und ausgewertet werden. Ein Hauptaugenmerk lag hierbei auf dem zeitlichen Verlauf von Früh – zur Spätphase nach KMT.

b) Situation des linienspezifischen Chimerismus im leukämischen Rezidiv

Im Rahmen der CML tauchen als Charakteristikum vermehrt atypische Zellformen der Megakaryopoese auf, die Mikromegakaryozyten. Es soll geklärt werden, inwiefern auch nach KMT diese morphologische Besonderheit als Ausdruck eines drohenden Rezidivs angesehen werden können. Ferner soll die Dynamik des megakaryozytären Chimerismus im Falle des Rezidivs durch die Untersuchung von sequentiellen Biopsien überprüft werden.

2 Material und Methode

2.1 Klinische Daten

Diese Arbeit beruht auf einer retrospektiven Untersuchung eines anonymisierten, historischen Block – und Datenarchivs von insgesamt 25 Knochenmarksbiopsien. Diese Biopsien wurden acht CML – Patienten in einem Zeitraum von 1987 bis 1996 sowohl vor als auch nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation (KMT) entnommen und für die diagnostische Aufarbeitung fixiert und in Paraffin eingebettet.

Das Patientengut und die anonymisierten klinischen Daten stammen aus der Klinik und Poliklinik für Knochenmarkstransplantation der Universität Essen (damaliger Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. U.W. Schäfer) und der Medizinischen Klinik III – Hämatologie und Onkologie, Städtisches Klinikum Leverkusen (damaliger Chefarzt: Professor Dr. med. N. Niederle,), wo die Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung behandelt und transplantiert worden sind. Sämtliche Patienten wurden im Rahmen von klinischen Studien geführt und gaben ihr Einverständnis für eine wissenschaftliche Analyse des Knochenmarkmaterials.

Die diagnostische Aufarbeitung und Archivierung der Proben erfolgte am Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.P. Dienes). Das ausgewählte Untersuchungskollektiv bestand aus jeweils vier männlichen und vier weiblichen Patienten, bei denen eine Philadelphia – Chromosom positive chronische myeloische Leukämie (Ph⁺ - CML) im chronisch stabilen Stadium nachgewiesen werden konnte. Zum Zeitpunkt der KMT betrug das Durchschnittsalter der Patienten 31 Jahre. Der jüngste Patient war 19 Jahre, der älteste 47 Jahre alt.

Im Vorfeld der Transplantation unterzogen sich die Patienten einer standardisierten Konditionierung bestehend aus einer kombinierten Radiochemotherapie. Diese bestand aus einer Single – Dosis oder fraktionierten Ganzkörperbestrahlung von 4x2,5 Gy mit Cobalt – 60 sowie 60 mg/kg*d des Alkylanz Cyclophosphamid intravenös über zwei Tage. Als Prophylaxe einer Graft-versus-Host-Erkrankung kamen der Folsäureantagonist Methotrexat und das Immunsuppressivum Cyclosporin A zum Einsatz. Im Verlauf der allogenen

Knochenmarktransplantation erhielten die Patienten unbehandeltes Knochenmark ($2,3 \times 10^8/\text{kg}$ mononukleäre Zellen) von HLA - kompatiblen, jedoch gegengeschlechtlichen Spendern. Die KMT wurde nach Standardverfahren durchgeführt (5,12,56)

Bei allen Patienten waren nach Transplantation die Kriterien eines klinisch, hämatologisch und histomorphologisch regelrechten Engraftments erfüllt.

Während des Beobachtungszeitraumes von bis zu 1938 Tagen nach KMT wurde bei vier Patienten die Diagnose eines Rezidivs gestellt. Ein Rezidiv war entweder als klinischer Beweis einer wiederkehrenden CML oder als Nachweis eines Philadelphia - Chromosoms an mindestens zwei Zeitpunkten fünfzig Tage oder mehr nach KMT definiert. Dies erfolgte im Mittel nach 621 Tagen. Die übrigen vier Patienten zeigten in der gesamten Zeitspanne keine Anzeichen für ein Rezidiv der Grunderkrankung oder eine Zweitneoplasie.

2.2 CD 61 – Immunhistochemie

2.2.1 Charakterisierung des Antikörpers Y2 / 51 (CD 61)

Der in dieser Untersuchung verwendete anti – CD61 Antikörper Y2/51 erkennt selektiv das Membran – Glykoprotein IIIa. Glykoprotein IIIa (GP IIIa) ist ein Bestandteil der thrombozytären Membran und lässt sich sowohl bei reifen Megakaryozyten als auch auf megakaryozytären Vorläuferzellen nachweisen (70,83,84,125,126,128). GP IIIa wird während der Megakaryopoese als erstes Glykoprotein exprimiert und ist bereits ab dem 4. Tag detektierbar (59,125,128). GP IIIa geht im Rahmen der Megakaryopoese mit GP IIb einen kalziumabhängigen, heterodimeren Komplex ein (39). Dieser Komplex kann auf der Membranaußenseite der Megakaryozyten und auch auf Osteoklasten und Endothelzellen detektiert werden (11,53,84,105,125). Nicht komplexiertes GP IIIa (CD61) ist demgegenüber ein megakaryozytenspezifischer Marker (11,105).

2.2.2 Immunhistochemische Charakterisierung der Megakaryozyten und ihrer Vorläuferzellen

3 µm dicke Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms von den eingeblockten Knochenmarkbiopsen angefertigt. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte mit Xylol (2 x fünf Minuten), die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 90 %, 70 % Ethanol) bis hin zu Aqua dest.. für jeweils 2 Minuten.

Die nun folgende Proteindemaskierung erfolgte durch Hitzedenaturierung mit Hilfe einer Mikrowellenbehandlung (Methode nach Pileri et al).

Im ersten Schritt äquilibrierten die Schnitte in einer Küvette in Citratpuffer, pH 6, um dann fraktioniert in 4 Zyklen für insgesamt 15 Minuten bei 700 Watt in der Mikrowelle zu inkubieren. Nach Abkühlung der Präparate folgte der eigentliche Färbevorgang nach der Standard- APAAP-Methode (26,68), siehe auch Abbildung 1.

Die Schnitte wurden in TBS (tris buffered saline) gespült. Dann wurden 60 µl des monoklonalen Maus-Anti-Glykoprotein IIIa (Y2/51-CD61, (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland)) in einer Verdünnung von 1:10 mit einem hintergrundreduzierenden Antikörperverschüttungsmedium (DAKO) auf jedes Präparat aufgetragen und bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erneut in TBS-Puffer gespült, bevor jetzt unter Verwendung des Brückenantigens Anti-Maus-IgG E413 in einer Verdünnung von 1:200 wiederum 60 µl pro Präparat aufgetragen wurden und die Schnitte so zur weiteren Inkubation für 35 Minuten bei 37° in den Wärmeschrank gelegt wurden.

Hiernach wurde wieder in TBS-Puffer gespült und dann 60 µl pro Präparat des Strept-AB-Komplexes (DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgetragen. Dieser setzt sich aus 98µl TBS-Puffer, 1µl Streptavidin und 1µl biotinierter alkalischer Phosphatase zusammen. Wieder wurde für 35 Minuten bei 37° im Wärmeschrank inkubiert.

Es folgte eine erneute Spülung in TBS-Puffer, um eine Absättigung des Brückenantikörpers mit dem Primärantikörper zu verhindern und die Anfärbung unspezifischer Bindungen zu verringern.

Nun wurde Nitrotetrazoliumblausäure/5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat (NBT/BCIP) auf jedes Präparat gegeben. Die Entwicklung erfolgte unter

lichtmikroskopischer Kontrolle. Eine deutliche Darstellung der CD61⁺-Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen führte zum Abstoppen der Reaktion. Diese Reaktion trat nach einer Zeitspanne von 0,5-30 Minuten ein. Die Präparate wurden zum Abstoppen der Reaktion terminal in TBS gespült.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung macht es möglich, spezifische Genabschnitte in einzelnen Zellen nachzuweisen und sichtbar zu machen. So lassen sich einzelne Gene, Chromosomenabschnitte und auch ganze Chromosomen an ihrem natürlichen Ort in Geweben, Zellen oder Zellkernen sichtbar machen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie diente das Verfahren dazu, bestimmte Regionen auf den Geschlechtschromosomen der Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen zu visualisieren.

Das X-Chromosom wurde in diesem Zusammenhang mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert, das Y-Chromosom mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff. Nach Abschluss der immunphänotypischen Charakterisierung der Megakaryozyten wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 % und reines Ethanol) dehydriert. Anschließend wurden sie mittels der Mikrowellenbehandlung auf die eigentliche Hybridisierung vorbereitet (19). Im Gegensatz zur vorangegangenen Behandlung in der Mikrowelle im Rahmen der Immunhistochemie wurde nun ein EDTA-Puffer pH 8,0 anstatt des Citratpuffers verwendet. Nach einer fünfminütigen Äquilibrierungszeit in diesem Puffer wurden die Präparate für drei Minuten in der Mikrowelle bei 700 Watt inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Spülen und Dehydratation der Präparate in einer Alkoholreihe bei 4°C für jeweils 2 Minuten.

Die Schnitte wurden nun bei Zimmertemperatur luftgetrocknet und anschließend zum erneuten Äquilibrieren für weitere fünf Minuten in TRIS-Puffer gespült. Eine weitere Denaturierung erfolgte mit Pronase E (60 µl, 100 mg Pronase E ad 100 ml Aqua dest.) in einer Verdünnung von 1:10 für ein bis drei Minuten. Nachdem diese enzymatische Andauung in 4° kaltem TRIS-Puffer abgestoppt worden war,

wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nun schloss sich die eigentliche Hybridisierung an. Es wurden jeweils 8 µl der Sondenmixtur CEP X (alpha-Satelliten; Centromerregion Xp11.1-q11.1) Spectrum Orange und CEP Y (Satellitenregion III; Yq12 [DYZ1-Locus]) Spectrum Green (VYSIS, Bergisch Gladbach, Deutschland) auf die Präparate aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und das Präparat mit rubber cement (Fixogum Marabu) zur Vermeidung einer Austrocknung abgedichtet. Die Präparate wurden nun auf einer Wärmeplatte bei 74°C für fünf Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine zügige Abkühlung auf 42°C. Die Präparate wurden dann über Nacht bei 42° in eine feuchte Kammer gegeben.

Für die folgende Hybridisierungswaschung wurden die Deckgläschen entfernt und die Schnitte für zwei Minuten in einen Waschpuffer 0,4 x SSC (sodium salt citrate; 0,3M NaCl, 0,03M Na3Citrat.2H2O, pH 7,3) bei 42°C gegeben. Anschließend wurden sie für eine weitere Minute in 2 x SSC/0,01% NP40 bei Raumtemperatur gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Als letzten Schritt erhielten die Präparate jeweils 10-13 µl DAPI Antifade (0,125mg DAPI/ml), (VYSIS, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Nun wurden die Präparate wiederum mit einem Deckglas versehen und mit rubber cement luftdicht verschlossen.

2.4 Auswertung und Differenzierung von den Wirts- und Spendermegakaryozyten

Die Auswertung der Präparate und die Differenzierung von Wirts- und Spendermegakaryozyten erfolgte an einem ARISTOPLAN Mikroskop der Firma Leitz (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Alle Präparate wurden meanderförmig durchmustert, um so eine doppelte Erfassung derselben Zellen auszuschließen. Zur Identifizierung der CD61⁺ Zellen wurde eine normale Lichtquelle, sogenanntes Durchlicht, verwendet, in dem die Zellen in einer dunkelblau-schwarzen Färbung sichtbar wurden. Mit einem zusätzlichen UV-Blaufilter wurde nun überprüft, in wieweit die DAPI-gefärbten Kerne noch intakt und somit verwertbar waren.

Um die Wirtszellen und die Spenderzellen voneinander abgrenzen zu können wurde ein Zweibandfilter in den Strahlengang eingesetzt. Durch diesen zusätzlichen Filter konnten gezielt die Wellenlängenbereiche für die hybridisierten Geschlechtschromosomen sichtbar gemacht werden. Das X - Chromosom wurde Rhodamin - rot dargestellt, das Y - Chromosom erschien in FITC – grün.

Filter	Anregungswellenlänge (nm)	Emitierte Wellenlänge (nm)
FITC (Spektrum Grün)	490	525
Rhodamin (Spektrum Orange)	540	550
DAPI	365	480

Tabelle 1: Wellenlänge der Filter

Die Auswertung erfolgte wie folgt:

1. Zellen ausschließlich mit zwei oder mehr Rotsignalen wurden als weibliche Zellen gewertet
2. Zellen mit Rot- und Grünsignalen wurden als männliche Zellen gewertet
3. Zellen mit ausschließlich grünen Signalen wurden als männliche Zellen gewertet

Für die weitere Dokumentation der Ergebnisse wurde für jedes Präparat eine Tabelle erstellt, wie in Abbildung 2 zu sehen ist. Aus allen auswertbaren Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen wurde abschließend das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Zellen ermittelt, das mit dem Verhältnis von Wirtszellen zu Spenderzellen gleichzusetzen ist.

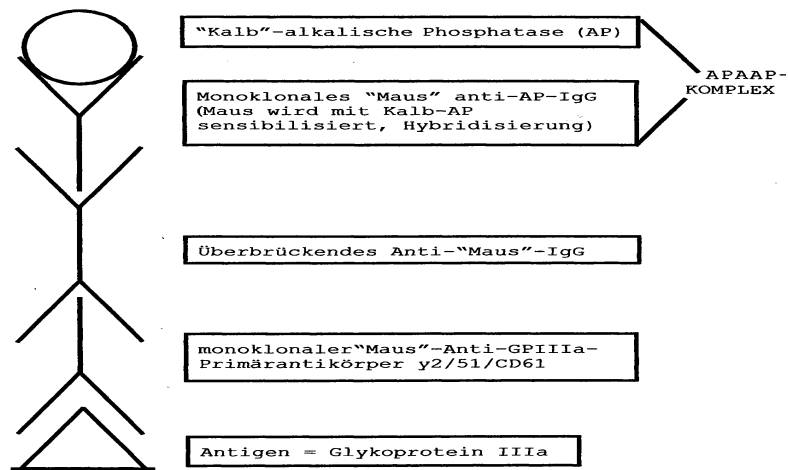


Abb. 3: Schematische Darstellung der APAAP-Methode
(Cordell et al., 1984)

Abbildung 1: Schematische Abbildung der APAAP – Methode (Cordell et al., 1984)

Patient	Kein Signal	Y (grün)	X (rot)	XY (rot/grün)	XX (rot/rot)	Summe	Verhältnis w/m	DT	Rezidiv

Abbildung 2: Tabelle zur Dokumentation der Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Übersicht über die Ergebnisse

Ausgewertet wurden sequentielle Knochenmarksbiopsien von acht Patienten, denen jeweils drei oder vier Einzelbiopsien zugeordnet werden konnten. Eine Probe, die als Kontrolle diente, wurde dabei vor der KMT entnommen. Als Zeichen der hohen Spezifität des Tests konnten im Knochenmark der Patienten vor der KMT lediglich Zellen mit dem Genotyp des Empfängers detektiert werden.

Patient	Geschlecht	Ohne Signal	Y	X	XY	XX	Gesamtzahl der Zellen	Empfänger	Spender
1	w	8	0	7	0	21	36	21	0
2	w	23	0	19	0	58	100	58	0
3	w	10	0	6	0	16	32	16	0
4	w	33	0	35	0	68	136	68	0
5	m	7	28	7	60	0	102	88	0
6	m	7	7	3	108	0	125	115	0
7	m	2	6	2	20	0	30	26	0
8	m	18	17	12	79	0	126	96	0

Tabelle 2: Kontrollbiopsien vor KMT

3.2 Allgemeine Übersicht über die Quantifizierung der Wirts- und Spenderzellen

Durch die sequentiell gekoppelten Techniken der Immunphänotypisierung und der FISH konnten genotypisch markierte Geschlechtschromosomen eindeutig der Megakaryopoese zugeordnet werden. Die geschlechtsspezifische Zuordnung der immunmarkierten Zellen erfolgte dabei unter Verwendung des in Abschnitt 2.4 skizzierten Algorithmus

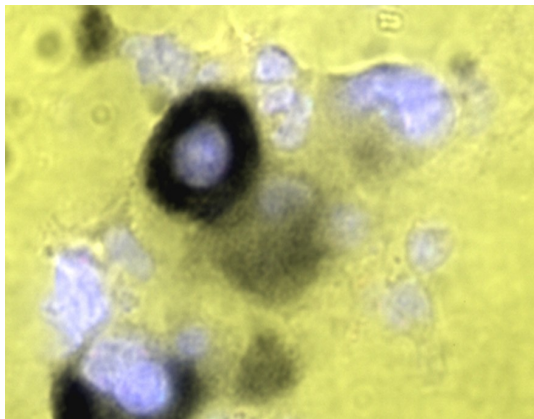


Fig. 1

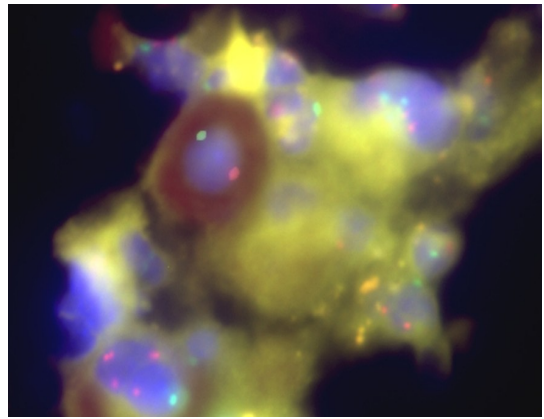


Fig. 2

Fig. 1: Zeigt eine durch anti-CD61 immunphänotypisierte Zelle, die somit der Megakaryopoiese zuzuordnen ist.

Fig. 2: Zeigt diesen Megakaryozyten nach FISH. Man erkennt jeweils ein rotes Signal (X-Chromosom) und ein grünes Signal (Y-Chromosom) im blau angefärbten Zellkern, es handelt sich also um eine männliche Zelle.

3.2.1 Erfolgreich transplantierte Patienten

Wie in Tabelle 3 veranschaulicht, konnte bei allen acht Patienten in den Biopsien nach allogener KMT der megakaryozytäre Chimärismus quantifiziert werden. Bei Addition aller Zeitpunkte nach Transplantation offenbarten die CD 61⁺ Megakaryozyten, zu denen auch die Vorläuferzellen wie z.B. die Pro – und Megakaryoblasten zu zählen sind, eine Restzahl von Wirtszellen, die zwischen 12% und 19% lag. Wurden die Ergebnisse in Daten der frühen und späten Rekonstitution unterteilt, zeigte sich, dass auch in späteren Phasen nach Transplantation konstant Wirtsmegakaryozyten nachweisbar waren und diese Zahl im Verlauf individuell auch nicht mehr wesentlich schwankte.

Tage nach KMT	Anzahl der Patienten (Biopsien)	Anzahl der CD61 ⁺ Megakaryozyten	Wirtszellen	Spenderzellen
> 19-59	5	210	26 (12)	184 (88)
> 60-586	7 ¹	253	49 (19)	204 (81)
Gesamt	12	463	75 (16)	388 (84)

Tabelle 3: Erfolgreiches Engraftment und rezidivfreies Überleben.

¹ Bei diesen Patienten wurden zwei zusätzliche Biopsien durchgeführt.

Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %

3.2.2 Leukämisches Rezidiv

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der erfolgreichen Transplantationen veränderte sich das Verhältnis von Wirts – und Spenderzellen in der Situation des leukämischen Rezidivs eindrucksvoll (Tabelle 4).

Bei den untersuchten Biopsien von vier Patienten trat im Zeitraum von 193 – 1938 Tagen nach KMT, parallel zu den klinisch / hämatologischen Zeichen des Rezidivs, eine Reduktion des gemischten Chimerismus auf.

Im Zustand des leukämischen Rezidivs konnte eine Anzahl von Megakaryozyten vom Typ der Empfängerzellen gefunden werden, die im Mittel nahezu 94% der insgesamt ausgewerteten Zellen erreichte. Die Zellen des Spenderknochenmarks hingegen waren nur noch in einer geringen Restmenge von knapp 7% auffindbar.

Tage nach KMT	Anzahl der Patienten (Biopsien)	Anzahl der CD61 ⁺ Megakaryozyten	Wirtszellen	Spenderzellen
> 193-650	3 ¹	235	220 (94)	15 (6)
➤ 1000-1938	2 ¹	107	99 (93)	8 (7)
Gesamt	5	342	319 (93)	23 (7)

Tabelle 4: Leukämisches Rezidiv

¹ Bei diesen Patienten wurden zwei zusätzliche Biopsien durchgeführt.

Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %.

3.3 Erfolgreiches Engraftment in der Posttransplantatperiode

Die Entwicklung des gemischten Chimerismus im Verlauf wurde gezielt durch Begutachtung sequentieller Knochenmarksbiopsien individueller Patienten verfolgt. Tabelle 5 zeigt diese Dynamik am Beispiel einer 30 – jährigen Frau, der in unterschiedlichen Zeitabständen Knochenmarksbiopsien entnommen wurden. In der Probe vor KMT konnten wie erwartet lediglich weibliche Zellen nachgewiesen werden. Im Rahmen eines erfolgreichen Engraftments nach KMT ließen sich sowohl zu einem frühen als auch zu einem späteren Zeitpunkt nur eine geringe Anzahl von residualen Empfänger megakaryozyten darstellen, die zwischen 9 % bis 17 % betrug, wohingegen sich Spender - Megakaryozyten mit Prozentzahlen von 83 % bis zu 91 % deutlich durchsetzen konnten. Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich klinische oder hämatologische Hinweise auf ein Rezidiv der Grunderkrankung.

Biopsieintervalle in Tagen								
DT	Kein Signal	Y	X	XY Spender	XX Wirt	Summe	Wirtszellen	Spenderzellen
Vor KMT - 37	8	0	7	0	21	36	21 (100 %)	0 (0)
Frühphase nach KMT + 27	5	5	6	38	4	58	4 (9%)	43 (91%)
Spätphase + 191	10	8	10	30	8	66	8 (17 %)	38 (83%)

Tabelle 5: Dynamik des gemischten Chimerismus der CD61⁺ Megakaryozyten nach einer gegengeschlechtlichen (Empfänger weiblich – Spender männlich) allogenen KMT und erfolgreichem Engraftment bei einer 30 – jährigen Frau anhand von sequentiellen Knochenmarkbiopsien

Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %

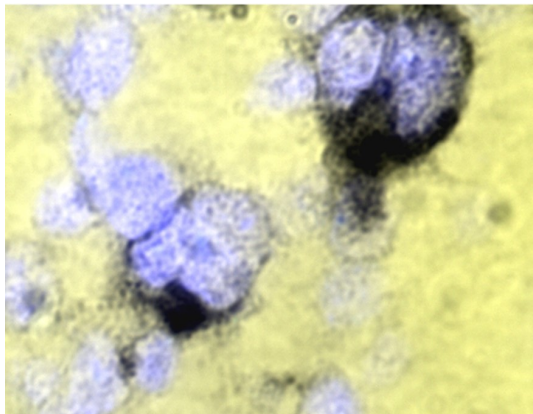


Fig 3

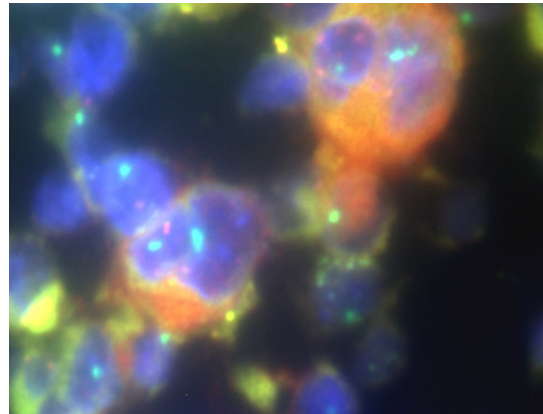


Fig. 4

Fig. 3 und Fig. 4: Zwei mehrkernige Megakaryozyten mit mehreren männlichen Chromosomenpaaren als Spenderzellen in einem weiblichen Wirtsorganismus als Zeichen des erfolgreichen Engraftments

Auch in Tabelle 6 lässt sich die Entwicklung des gemischten Chimerismus anhand der Sequenzbiopsien eines 42 – jährigen Mannes gut beobachten.

Bereits 20 Tage nach der KMT überwiegen die Spenderzellen mit 88% gegenüber den nur noch in geringer Anzahl vorhandenen Wirtszellen mit 12%. Dieser Chimerismus vom Spendertyp zeigt sich auch 127 Tage nach KMT stabil mit einem noch rückläufigem Anteil an Wirtszellen mit jetzt nur noch 8% gegenüber einem dominanten Anteil von 92% Spenderzellen.

Biopsieintervalle in Tagen								
DT	Kein Signal	Y	X	XY Wirt	XX Spender	Summe	Wirtszellen	Spenderzellen
Vor KMT - 22	2	6	2	20	0	30	20 (100)	0 (0)
Frühphase nach KMT +20	9	1	7	5	46	68	6 (12)	46 (88)
Spätphase + 127	4	1	4	3	44	56	4 (8)	44 (92)

Tabelle 6: Dynamik des gemischten Chimerismus der CD61⁺ Megakaryozyten nach einer gegengeschlechtlichen (Empfänger männlich – Spender weiblich) allogenen KMT und erfolgreichem Engraftment bei einem 42 – jährigen Mann anhand von sequentiellen Probebiopsien

Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass sich bei allen Patienten mit erfolgreichem Engraftment ein stabiler Chimerismus vom Spendertyp mit einer geringfügigen Dynamik in der Verhältnisaufteilung zwischen Spenderzellen und Residualzellen des Empfängers entwickelt.

3.4 Leukämisches Rezidiv in der Posttransplantatperiode

Die Entwicklung des gemischten Chimerismus im Rahmen eines leukämischen Rezidivs verändert sich hingegen abrupt.

Tabelle 7 zeigt die unterschiedliche Dynamik anhand von sequentiellen Biopsien einer 29 – jährigen Frau sowohl vor als auch in verschiedenen Abständen nach KMT.

Zum Zeitpunkt des klinischen / hämatologischen Rezidivs, das an Tag 494 beschrieben wird, zeigt sich hier eine Umkehr des gemischten Chimerismus mit nahezu vollständiger Eliminierung der Spendermegakaryozyten. War in der Frühphase nach KMT noch ein Ergebnis mit 93% Spenderzellen gegenüber 7% Wirtszellen zu beobachten, zeigt sich in der Spätphase nach KMT nach 551 Tagen eine ausgeprägte Dynamik mit einem deutlichen Wechsel des Chimerismus zum Wirtstyp. Es zeigen sich jetzt lediglich noch 16% Spenderzellen, wohingegen sich die Wirtszellen mit 84% wieder durchsetzen.

Biopsieintervalle in Tagen								
DT	Kein Signal	Y	X	XY	XX	Summe	Wirtszellen	Spenderzellen
Vor KMT - 14	33	0	35	0	68	136	68 (100)	0 (0)
Frühphase nach KMT + 35	6	10	5	10	2	38	2 (7)	25 (93)
Spätphase nach KMT + 551	17	3	24	15	70	124	70 (84)	13 (16)

Tabelle 7: Dynamik des gemischten Chimerismus der CD61⁺ Megakaryozyten nach einer gegengeschlechtlichen (Empfänger weiblich – Spender männlich) allogenen KMT und Entwicklung eines leukämischen Rezidivs bei einer 29– jährigen Frau anhand der Analyse von sequentiellen Knochenmarkbiopsien. Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %.

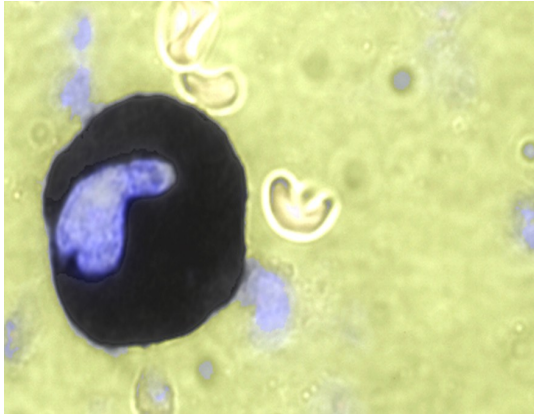


Fig.5

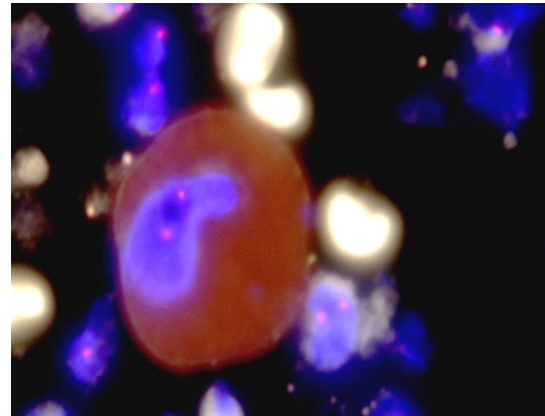


Fig.6

Fig. 5 und Fig. 6: Als Zeichen des leukämischen Rezidivs findet man bei der weiblichen Patientin 551 Tage nach KMT eine Umkehrung des gemischten Chimerismus mit weitgehend nur noch Megakaryozyten des Wirtstyps.

Bei einem 47-jährigen Patienten kamen drei Biopsien nach KMT zur Beobachtung. Die beiden letzten Biopsien erfolgten kurz vor und nach dem Zeitpunkt des klinischen Rezidivs des Patienten, der klinisch / hämatologisch 539 Tage nach KMT festgestellt wurde.

Am 71. Tag nach KMT zeigte sich noch ein gemischter Chimerismus vom Spendertyp mit 77% Spenderzellen und 23% Wirtszellen. In den nachfolgenden Biopsien 489 und 604 Tage nach KMT lässt sich eine stetige Abnahme der Spenderzellen beobachten. 489 Tage nach KMT, noch vor der klinischen Manifestation des Rezidivs des Patienten, kann man histopathologisch bereits eine Umkehr des Chimerismus zum Wirtstyp feststellen. Es zeigen sich nur noch 36% Spenderzellen bei einem Anteil der Wirtszellen von 64%. Diese Dynamik entwickelt sich bis zu einem nahezu vollständigen Verlust der Spenderzellen. 604 Tage nach KMT sind nur noch eine minimale Anzahl von Spenderzellen zu finden, wohingegen die Wirtszellen mit 98% dominieren.

Biopsieintervalle in Tagen								
DT	Kein Signal	Y	X	XY Wirt	XX Spender	Summe	Wirtszellen	Spenderzellen
Vor KMT - 18	7	28	7	60	0	102	88 (100)	0 (0)
Frühphase nach KMT +71	11	3	14	8	36	72	11 (23)	36 (77)
Spätphase +489	2	4	1	12	9	28	16 (64)	9 (36)
Spätphase +604	20	34	1	58	2	115	92 (98)	2 (2)

Tabelle 8: Dynamik des gemischten Chimerismus der CD61⁺ Megakaryozyten nach einer gegengeschlechtlichen (Empfänger männlich – Spender weiblich) allogenen KMT mit Entwicklung eines leukämischen Rezidivs bei einem 47 – jährigen Mann untersucht an sequentiellen Probebiopsien.
Die Angaben in Klammern entsprechen den vorherigen Angaben in Prozent %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Patienten mit einem Rezidiv der CML eine Umkehr des Chimerismus vom Spender – zum Empfängertyp vollziehen, das sogenannte Konversionsphänomen. Trotz einer teilweise nur sehr geringen Anzahl an verbleibenden Wirtszellen nach KMT kann die Spendermegakaryopoese in der nachfolgenden Zeit dennoch nahezu komplett verdrängt werden.

4 Diskussion

4.1 Kritische Anmerkungen zur Methodik

Diese Arbeit will den Zusammenhang zwischen dem gemischten Chimerismus der Megakaryopoese und der Entwicklung des erfolgreichen Engraftments sowie des leukämischen Rezidivs aufzeigen. Die Auswahl von Knochenmark – bzw. stammzelltransplantierten Patienten mit Spendern, die dem jeweils anderen Geschlecht angehören, machen es möglich, über geschlechtsdiskriminierende methodische Ansätze das Ausmaß des Chimerismus auf zellulärer Ebene zu detektieren (45,55,82,91). Durch die Darstellung des spezifischen Phänotyps einer Zelle können zusätzlich einzelne Zellreihen getrennt untersucht werden. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind die Techniken der Polymerasekettenreaktion und der Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung (FISH). Die PCR ist die Methode, die zum einen leichter durchführbar ist und zum anderen eine deutlich höhere Sensitivität aufweist. Bei entsprechender Auswahl der Primer und Reaktionsbedingungen besteht die Möglichkeit, selbst eine einzige abnormale Zelle unter einer Million Zellen auszumachen (2,3,47,72,78,83,87). Die Untersuchung extrahierter DNS aus peripherem Blut oder dem Knochenmark lässt aber eine Zuordnung zu den einzelnen Zellreihen und insbesondere eine histotopographische Zuordnung der neoplastischen Zellen nicht zu. Gerade dies ist aber zu fordern, wenn man die Verteilung des geschlechtsspezifischen Chimerismus im Effektororgan, dem Knochenmark, wie in unserer vorliegenden Studie beschreiben möchte. Hierbei bietet die FISH – Technik in Kombination mit einer immunhistochemischen Färbung entscheidende Vorteile. Als Nachteil ist neben der geringeren Sensitivität im Vergleich zur PCR ebenfalls die eingeschränkte Sensitivität und Spezifität im Sinne Fehler 2. Ordnung (falsch – positive und falsch – negative Ergebnisse zu einem Prozentsatz von 0,2% - 4%) zu nennen (56,90). Eine Quantifizierung von Ergebnissen der FISH – Technik ist bei großer Variationsbreite der Proben, die sich z.B. durch die ungleiche Schnittführung mit daraus resultierendem verschiedenartigem Anschneiden der Zellkerne und verschieden großer Gewebsdichte und – dicke innerhalb einer Probe auszeichnet, äußerst problematisch (19). So kann es durchaus vorkommen, dass trotz eines gut zu

beurteilenden Zellkerns im histologischen Schnitt dieser in der FISH – Technik ein negatives Ergebnis für die Geschlechtschromosomensonden aufweist, da diese entweder oberhalb oder unterhalb der Schnittebene lagen und somit nicht auf dem Schnitt erfasst sind. Verhältnisse von unterschiedlichen Zellen, wie in unserem Fall der Vergleich von weiblichen und männlichen Zellen, können nur unter der Voraussetzung der ähnlichen Morphologie der Zellen erhoben werden. Der dieser Studie zugrunde liegende methodische Ansatz, lediglich Zellen auszuwerten, die zwei Chromosomensignale zeigten, konnte den in der Literatur beschriebenen Fehler im Vergleich mit Studien, bei denen nur das Y – Chromosom detektiert wurde, deutlich reduzieren (65). Jeder Patient wurde mit einer internen Kontrolle in Form der Knochenmarkbiopsie vor Transplantation auf mögliche methodische Fehler überprüft.

Da die Art der Transplantation einen enormen Einfluß auf das Ausmaß des Chimerismus hat (34) wurden ausschließlich Patienten mit identischen Therapieprotokollen in die Studie eingeschlossen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Standard im Rahmen des Monitorings der CML ist inzwischen die molekulare Kontrolle, die mittels quantitativer Polymerase – Kettenreaktion (PCR) durch die Messung der BCR – ABL – mRNA erfolgt. Anhand des dieser Studie zugrunde liegenden historischen Materials konnten weitere aktuelle Erkenntnisse für die Entwicklung der Hämatopoiese besonders in der Posttransplantatperiode erhoben werden. Es soll die Entwicklung des gemischten Chimerismus und im Besonderen dessen Rolle für die Diagnostik des leukämischen Rezidivs näher beleuchtet werden.

Im Rahmen des erfolgreichen Engraftments traten bei den untersuchten Patienten im Knochenmark sowohl Zellen vom Empfänger als auch vom Spender auf. Das Verhältnis ist deutlich in Richtung der Spenderzellen verschoben, die Empfängerhämatopoiese ist jedoch zu jedem Zeitpunkt nach erfolgreicher Transplantation weiterhin relativ konstant nachweisbar. Im Mittel konnten 84% Spenderzellen und 16% Zellen der Empfängerhämatopoiese erfasst werden (siehe Tabelle 3). Da diese Patienten über den gesamten Untersuchungszeitraum nach Transplantation eine molekulare Remission boten, belegen diese

Ergebnisse, dass die verbliebenen Zellen der Wirtsmegakaryopoese, die nicht dem leukämischen Klon angehören, mit den eingewanderten Spenderzellen kooperieren. Um so eine Kooperation der residualen Empfänger – und Spenderhämatopoiese zu ermöglichen, muß eine möglichst optimale Umgebung zur Einnistung der Spenderzellen gegeben sein. Die T – Lymphozyten des Spenders sind dafür zuständig, die nach myeloablativer Therapie verbliebenen Empfängerzellen, die leukämischen Ursprungs sind, so zahlreich wie möglich zu eliminieren. Das setzt jedoch voraus, dass die T – Lymphozyten in der Lage sind, die Zellen als benigne oder maligne zu unterscheiden. Wäre diese Fähigkeit der Differenzierung der T – Zellen nicht gegeben, wäre eine weitreichendere Auslöschung der Empfängerhämatopoiese gegeben.

Die CML als klonale Stammzellerkrankung umfasst sowohl die hämatologischen Zellreihen als auch die B – und T – lymphozytäre Reihe (28,56). Bisherige Untersuchungen galten vor allem den B – und T – Lymphozyten. Anhand unserer Studie wird die Beteiligung der megakaryozytären Zellreihe näher beleuchtet, der zuvor nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden ist.

Dem Megakaryozyt kommt eine besondere Rolle bei der CML zuteil. Charakteristisches Merkmal sind die atypischen Mikromegakaryozyten, die das Zellbild dominieren. Je häufiger diese Zellformen beobachtet werden können, desto schlechter fällt die Prognose für ein erfolgreiches Engraftment aus (96,116,120). Die megakaryozytäre Zellreihe zeigt im Rahmen des leukämischen Rezidivs Veränderungen im Sinne einer Reduktion des gemischten Chimerismus. Kann man im Stadium des erfolgreichen Engraftments noch ein deutliches Überwiegen der Spenderzellen erkennen, so verändert sich das Verhältnis in der Situation des leukämischen Rezidivs zugunsten der Empfängerpopulation der Megakaryopoese. In unserer Untersuchung entfallen 93% der megakaryozytären Zellen inklusive ihrer Vorläuferzellen auf den residualen Empfängertyp. Immer noch 7% repräsentieren die Gruppe der Spenderzellen. Anhand der Auswertung der sequentiellen Biopsien mit Untersuchungen kurz nach KMT und ein weiteres Mal in der Spätphase nach KMT kann man erkennen, dass bereits eine geringe Anzahl an residualen Wirtszellen schon kurz nach KMT in der Lage ist, die Spendermegakaryopoese komplett zu verdrängen. So ergibt sich eine Umkehr des Chimerismus vom Spender – zum Empfängertyp, das sogenannte Konversionsphänomen. Die Ergebnisse, insbesondere des Patienten in Tabelle 8

dargestellt, legen den Verdacht nahe, dass das Konversionsphänomen bereits vor der klinischen Feststellung eines Rezidivs auftritt. Das Verfahren scheint also als histopathologischer Frühindikator eines leukämischen Rezidivs geeignet zu sein.

4.3 Vergleich mit dem Chimerismus der T – und B – Lymphozyten

Um die Dynamik des gemischten Chimerismus und dessen Bedeutung für die Entwicklung eines leukämischen Rezidivs richtig einordnen zu können, ist es wichtig, die Ergebnisse für die Megakaryopoese mit Untersuchungen, die weitere Zellen der Hämatopoese betreffen, zu vergleichen. In anderen Studien standen vor allem die T – und B – Lymphozyten im Vordergrund (45,52). Hier wurde beschrieben, dass diese Zellformen beim Auftreten eines Rezidivs der CML einen gemischten Chimerismus aufzeigen. Dieser Chimerismus zeichnet sich durch ein deutliches Überwiegen der Spenderzellen aus, manche Autoren berichten sogar von einem kompletten Spenderchimerismus der lymphozytären Reihe (7,83). In diesem Fall haben die T – Zellen nicht effektiv gegen den leukämischen Klon gearbeitet, es fand also keine Abwehrreaktion im Sinne einer GvLR statt. Auch die B – Zell – Population ist im Zustand des Rezidivs in der Mehrzahl vom Empfängertyp.

Insbesondere der gemischte Chimerismus der T – Lymphozyten vermag die Entwicklung eines leukämischen Rezidivs zu begünstigen. Dies beruht auf einer Spender – Empfänger – Immuntoleranz, die ursächlich durch die T – lymphozytäre Population ausgelöst wird. Es kommt zu einem verminderten GvL – Effekt. Durch dieses Phänomen wird das Persistieren der leukämischen Zellen im Empfänger Knochenmark erleichtert, wobei die Anzahl der Spenderzellen der Anzahl der residualen Wirtszellen trotzdem überlegen ist (45,52).

Es lässt sich also festhalten, dass die Quantifizierung des Chimerismus der T – Zellreihe nur wenig über ein anbahnendes Rezidiv auszusagen vermag. Wie bereits erwähnt ist bei der CML die hämatopoetische Zellreihe und die B – Lymphopoese in erster Linie betroffen, während die T - lymphoide Reihe nicht neoplastisch transformiert ist (83). Dementsprechend sind die Lymphozyten auch nicht am Aufbau des leukämischen Klon beteiligt. So kommt es, dass sich die

Spender – T – Zellen im ansonsten durch residuale Zellen der Wirtshämatopoese geprägten Knochenmark durchaus durchsetzen können.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse für die hämatopoetische Zellreihe im engeren Sinne einschließlich der Megakaryopoese. Hier zeigt sich im Rahmen des leukämischen Rezidivs ebenfalls ein gemischter Chimerismus, der jedoch ein Überwiegen der Empfängerzellpopulation aufweist, wobei es sich hierbei um residuale Zellen des malignen Klons handelt.

Abschließend kann also im Stadium des leukämischen Rezidivs eine entgegengesetzte Tendenz des Verhältnisses zwischen Empfänger – und Spenderzellen bei Lymphozyten und Zellen der megakaryozytären Reihe festgehalten werden.

4.4 Vergleich mit dem Chimerismus der CD34+ - Vorläuferzellen und den Makrophagen als Repräsentanten der myeloiden Reihe

Bei allen hämatopoetischen Zellreihen kann das Phänomen des gemischten Chimerismus nach Stammzelltransplantation beobachtet werden. Zwei Zellformen, die mit der Entwicklung eines Rezidivs in Zusammenhang gebracht werden, sind die CD34+ - Vorläuferzellen (progenitor cells = PGC) und die Makrophagen. Die Vorläuferzelle ist Ausgangspunkt der gesamten Hämatopoese und kann durch ihr eigenes Oberflächenantigen CD34 identifiziert werden. In anderen bereits vorhandenen Studien wird von einem gemischten Chimerismus berichtet, der in der Situation des frühen leukämischen Rezidivs einen deutlich höheren Prozentsatz an Empfängerzellen aufweist als reifere Zellen der Hämatopoese. Nur ein kleiner Teil dieser Zellen ist allerdings bcr – abl positiv. Danach waren lediglich noch 10% der Zellen des gespendeten Knochenmarks auffindbar (45,103). Sie werden als primitive leukämische Zellen beschrieben, die als Restfraktion die myeloablative Behandlung überlebt haben und so als Zellen des residualen Pools den Ursprung des leukämischen Rezidivs bilden sowie mitbeteiligt am Entstehen der minimal residual disease sind (41,44,103). In diesem Pool befinden sich überwiegend Zellen der Empfängerpopulation, die als Ausgangspunkt eines Rezidivs fungieren können. Während ihres inaktiven Status

nehmen sie nicht am Zellzyklus teil, können aber zu Wachstum und Proliferation stimuliert werden. Um dies zu verhindern, ist heutzutage die lebenslange Einnahme des Tyrosinkinasehemmers Imatinib notwendig, um so die dauerhafte klinische Remission gewährleisten zu können.

Das Auftreten eines linienspezifischen Chimerismus nach KMT ist auch bei den CD34+-Vorläuferzellen ein häufiger Befund. Ihre Beteiligung liegt in der Frühphase nach der Transplantation bei bis zu 25%. Zum Zeitpunkt der leukämischen Transformation waren ca 90% der PGC vom Empfänger abstammend (119). Demgegenüber stehen 93% residuale, megakaryopoetische Zellen bei unserer Untersuchung. Auch in der Zellreihe der Makrophagen kann das Auftreten eines gemischten Chimerismus nach KMT beobachtet werden. (138). Die Makrophagen des Knochenmarkstromas gelten neben den PGC als Mediatoren bei der Entwicklung und Ausbreitung des malignen leukämischen Zellklons (11). Sie sind in der Lage, über die Abgabe von Zytokinen Einfluss auf die Steuerung der Hämatopoese zu nehmen. Bis zu drei Monate nach KMT konnten 8-10% Wirtsmakrophagen detektiert werden, im Fall eines leukämischen Rezidivs fand sich ein erhöhter Anteil von 50% Makrophagen der Empfängerzellen (138).

Die Unterschiede im Ausmaß des gemischten Chimerismus beruhen wahrscheinlich auf der jeweiligen Zellkinetik. So haben Makrophagen als endständige Zellen einen langsameren Zellumsatz als die rasch proliferierenden PGC und die sich ebenfalls noch teilenden Vorläuferstadien der Megakaryozyten.

4.5 Besonderheiten bei der Auswertung der Megakaryozyten im Vergleich zu den anderen myeloischen Zellelementen

Im Vergleich der Megakaryozyten zu anderen Zellelementen des Knochenmarks fällt eine deutliche Diskrepanz in der Rate des Auftretens eines gemischten Chimerismus auf. Es lassen sich innerhalb dieser Zellpopulation deutlich mehr Zellen mit einem positiven Signal ausmachen als bei Zellarten, die uns zu einem Vergleich zur Verfügung standen. Wie bereits oben erwähnt (siehe 2.2.1) können durch die immunhistochemische Färbung des CD61+ - Antigens nicht nur ausgereifte Megakaryozyten sondern auch ihre Vorläuferzellen kenntlich gemacht werden (94) und so mit in die Untersuchung einfließen. Die Zellen der

Megakaryopoese zeichnen sich weiterhin dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den anderen aufgeführten Zellarten als einzige einen polyploiden Aufbau besitzen (51,119). Das bedeutet, dass sie ebenfalls mehrfache Chromosomenpaare besitzen, die in den einzelnen Kernen in verschiedenen Ebenen angelegt sind. Daher sind die Chancen ungleich größer, die Geschlechtschromosomen anzufärben und somit mindestens zwei oder mehr positive Signale in einem einzigen histologischen Anschnitt des zu untersuchenden Gewebes zu erhalten. Im Gegensatz dazu stehen die anderen Zellen der Hämatopoese, die pro einzelne Zelle nur über einen einfachen diploiden Chromosomensatz verfügen. Dieses Chromosomenpaar wird aber nicht in jeder untersuchten Probe in der richtigen Ebene angeschnitten und dargestellt, so dass es schwieriger ist, ein komplettes Paar sichtbar zu machen. Deshalb kann der Anteil der positiv gewerteten Zellen der Megakaryopoese das zwei – bis dreifache der anderen Zellarten ausmachen. Dieses Phänomen sollte im Hinblick auf das Ausmaß des gemischten Chimerismus innerhalb dieser Zellreihe berücksichtigt werden. Im erfolgreichen Engraftment sind im Mittel 16% der Megakaryozyten der Wirtshämatopoese zuzuordnen. Dieser Wert steigt mit der zunehmenden Dauer nach Transplantation an. Bei Eintreten eines leukämischen Rezidivs kann eine Umkehr des Mengenverhältnisses der Empfänger – und Spenderhämatopoese beobachtet werden. Es findet sich nun eine nahezu komplett verdrängte Spenderpopulation mit 7% gegenüber mit 93% dominierenden Empfänger-megakaryozyten.

5 Zusammenfassung

Die Thematik dieser Arbeit befasst sich mit einer retrospektiven Untersuchung des gemischten Chimerismus der Zellreihe der Megakaryopoese im Rahmen der chronischen myeloischen Leukämie vor und nach allogener gegengeschlechtlicher Knochenmarktransplantation. Dazu wurden Knochenmarkbiopsien von insgesamt acht Patienten davon jeweils vier weiblichen und männlichen Geschlechts, aus einem Zeitraum von 9 Jahren untersucht. Für jeden Probanden standen jeweils eine Biopsie vor und mehrere Biopsien nach KMT zur Verfügung. Mittels sequentieller Immunophänotypisierung und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erfolgte die Analyse des gemischten Chimerismus der Megakaryozyten. Zur linienspezifischen Phänotypisierung kam der monoklonale Antikörper Y2/51 gegen das Oberflächenantigen CD61 zum Einsatz. Der Genotyp der Zellen wurde durch X- und Y – spezifische Sonden und der Technik der FISH bestimmt. Ein besonderes Augenmerk lag bei unseren Untersuchungen auf der Dynamik und den signifikanten Unterschieden des gemischten Chimerismus in den Situationen des erfolgreichen Engraftments und rezidivfreien Überlebens und des leukämischen Rezidivs. Im Falle der erfolgreichen Transplantation und des rezidivfreien Überlebens zeigte sich ein deutliches Überwiegen der Spenderzellen von 84 %, wohingegen sich das Ausmaß der ursprünglichen Generation der Megakaryozyten auf lediglich 16 % beschränkt. In den Kontrollen vor KMT konnten ausschließlich Zellen des Genotyps der Empfänger nachgewiesen werden, entsprechend der ausgezeichneten Spezifität des Tests. Bei allen Patienten änderte sich dieses Ergebnis im Fall des leukämischen Rezidivs eindrucksvoll. Jetzt konnten hauptsächlich Zellen des ursprünglichen Zellpools der Empfänger - Megakaryopoese mit 93 % beobachtet werden. Es kam zu einer Konversion des gemischten Chimerismus mit Verdrängen der Spenderzellen auf nur noch 7 %.

Abschließend kann festgehalten werden, dass der gemischte Chimerismus an der megakaryozytären Zellreihe in einem höheren Ausmaß beobachtet werden kann als in den anderen hämatopoetischen Zellreihen. Anhand der sequentiellen Untersuchungen in der frühen und späten Posttransplantatperiode kann eine Umkehr des gemischten Chimerismus im Rahmen des leukämischen Rezidivs

beobachtet werden. Diese Verlagerung vom Überwiegen der Spenderzellen zu einem Hauptauftreten der Empfängerzellen kann als Konversionsphänomen als ein wichtiger Frühindikator für ein drohendes Rezidiv aufgefasst werden und korreliert mit der Beobachtung eines Wiederauftretens zytologischer Atypien in dieser Zellreihe.

6 Literaturverzeichnis

1. Albrecht T, Schwab R, Henkes M: Primary proliferating immature myeloid cells from CML patients are not resistant to induction of apoptosis by DNA damage and growth factor withdrawal; *Br J Haematol* 1996, 95, 501-507
2. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, Lamy T, Le Prise PY, Beauplet A, Bories D, Semana G, Quelvennec E: Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction; *Blood* 2002, 99, 4618-4625
3. Angstreich GR, Smith BD, Jones RJ: Treatment options for chronic myeloid leukemia: imatinib versus interferon versus allogenic transplant; *Curr Opin Oncol* 2004, 16, 95-99
4. Appelbaum FR, Clift R, Radich J, Anasetti C, Buckner CD: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia; *Semin Oncol* 1995, 22, 405-411
5. Barrett J, Childs R: Non – myeloablative stem celltransplants; *Br J Haematol* 2000, 111, 6-17
6. Basecke J, Griesinger F, Trumper L, Brittinger L: Leukemia- and lymphoma-associated genetic aberrations in healthy individuals; *Ann Hematol* 2002, 81, 64-75
7. Baurmann H, Nagel S, Binder T, Neubauer A, Siegert W, Huhn D: Kinetics of the graft-versus-leukemia response after donor leukocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukemia after allogenic bone marrow transplantation ; *Blood* 1998, 92, 3582-3590
8. Beckstead JH, Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Bainton DF: Immunohistochemical localization of membrane and alpha-granule proteins in human megakaryocytes: application to plastic-embedded bone marrow biopsy specimens ; *Blood*, 1986, 67, 285
9. Beelen DW, Graeven U, Elmaagacli AH, Niederle N, Kloke O Opalka B, Schaefer UW: Prolonged administration of interferon-alpha in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia

- before allogenic bone marrow transplantation may adversely affect transplantant outcome; *Blood* 1995, 85, 2981-2990
10. Bernasconi P, Cavigliano PM, Genini E, Alessandrino EP, Colombo A, Klersy C, Malcovati L, Biaggi G, Martinelli G, Calatroni S, Caresana M, Boni M, Astori C, Bernasconi C: Assessment of chimerism in sex-mismatched allogenic bone marrow transplants (allo-BMT) by in situ hybridizations and cytogenetics. Is host cell percentage predictive of relapse?; *Leukemia* 1997, 11, 1989-1990
 11. Bhatia R, Verfaillie CM: The effect of interferon-alpha on beta 1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia; *Leuk Lymphoma* 1998, 28, 241-254
 12. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum; *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93, 705-708
 13. Boll IT: Origin of the early megakaryopoietic progenitor cell and further polyploidization in the thrombopoietic cell series. Phase-contrast observations of human bone marrow; *Acta Haematol* 1981, 66, 187
 14. Buhr T, Choritz H, Georgii A: The impact of megakaryocyte proliferation of the evolution of myelofibrosis. Histological follow-up study in 186 patients with chronic myeloid leukemia; *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992, 420, 473
 15. Buhr T, Georgii A, Choritz H: Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover Classification; *Pathol Res Pract* 1993, 189, 121
 16. Bull JH, Harnden P: Efficient Nuclear FISH on Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Microwave Pretreatment ; *BioTechniques*, 1999, 26, 416-418
 17. Burri PH, Tarek MR: A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation; *Anat Rec*, 1990, 228, 35-45
 18. Breton-Gorius J, Reyes F: Ultrastructure of human bone marrow cell maturation ; *Int Rev Cytol*, 1976, 46, 251
 19. Breton-Gorius J, Vainchenker W: Expression of platelet proteins during the in vitro and in vivo differentiation of megakaryocytes and morphological aspects of their maturation; *Semin Hematol*, 1986, 23, 43

20. Champlin R, Khouri I, Shimon A: Harnessing graft – versus – malignancy: non – myeloablative preparative regimens for allogenic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy; *Br J Haematol* 2000, 111, 18-29
21. Clift RA, Storb R: Marrow transplantation for CML: the Seattle experience; *Bone Marrow Transplant* 1996, 17, 1-3
22. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY: Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APPAP complexes) ; *J Histochem Cytochem* 1984, 32, 219
23. Dekmezian R, Kantarjian HM, Keating MJ et al: The relevance of reticulin stainmeasured fibrosis at diagnosis in chronic myelogenous leukemia ; *Cancer*, 1987, 59, 1739-1743
24. Derrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera C, Gonzalez MG, Reina L, Rodriguez MC, Alvarez MA, Maldonado J, Torres A: Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210 (BCR-ABL) and p190 (BCR-ABL) after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Increasing mixed myeloid chimerism and p190 (BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse ; *Blood* 2000, 95, 2659-2665
25. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, Thibodeau SN, Jalal SM: The application of fluorescence in situ hybridization to detect Mbc/ abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL ; *Cancer Genet Cytogenet* 1993, 71, 7
26. Durnam DM, Anders KR, Fisher L, O`Quigley J, Bryant EM, Thomas ED: Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y – chromosome – specific in situ hybridization assay; *Blood* 1989, 74, 2220-2226
27. Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, Opalka B, Trensche R, Seeber S, Schafer UW, Beelen DW: A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogenic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase; *Bone Marrow Transplant* 2001, 27, 809-815

28. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T: Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage ; *Am J Med* 1977, 63, 125-130
29. Formankova R, Honzatkova L, Moravkova J, Sieglova Z, Dvorakova R, Nadvornikova S, Vitek A, Lukasova M, Stary J, Brdicka R: Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy ; *Leuk Res* 2000, 24, 339-347
30. Fox SB, Lorenzen J, Heryet A, Jones M, Gatter KC, Mason DY: Megakaryocytes in myelodysplasia: an immunohistochemical study on bone marrow trephines; *Histopathology* 17, 69, 1990
31. Gatter KC, Cordell JL, Turley H, Heryet A, Kieffer N, Anstee DJ, Mason DY: The immunohistological detection of platelets, megakaryocytes and thrombi in routinely processed specimens ; *Histopathology* 1988, 13, 257-267
32. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, Choritz H, Dohler U, Kaloutsi V, Werner M: Chronic myeloproliferate disorders in bone marrow biopsies; *Pathol Res Pract* 1990, 186, 3
33. Goldman JM, Apperley JF, Jones L: Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia; *N Engl J Med* 1986, 314, 202-207
34. Goldman JM, Druker BJ: Chronic myeloid leukemia: current treatment options ; *Blood* 2001, 98, 2039-2042
35. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase, Increased risk for relapse associated with T – cell depletion; *Ann Intern Med* 1988, 108, 806-814
36. Gordon MJ: Regulation of growth in chronic myeloid leukemia; *Leuk Lymphoma* 1993, 11, 75-79
37. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP et al: Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia ; *Nature* 1987, 328 (6128) 342-344

38. Grant BW, Solberg L, Nichols W, Mann KG: Proliferation and maturation of human megakaryocytes in vitro; *Ann N Y Acad Sci* 1987, 509, 34
39. Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM: Risk assessments for patients with chronic myeloid leukemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; *Lancet* 1998, 352, 1087-1092
40. Griesshammer M, Heimpel H: Die chronische myeloische Leukämie – Neueste Aspekte und praktische Fortschritte der letzten Jahre; *Med Klein* 1995, 90, 527
41. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A: Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia ; *Blood* 1999, 94, 2056-2064
42. Horowitz MM, Rowlings PA, Passweg JR: Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry; *Bone Marrow Transplant* 1996, 17, 5-6
43. Hourdille P, Benabdallah S, Belloc F, Nurden AT: Distribution of glycoprotein IIb/IIIa complexes in the surface membranes of human platelets and megakaryocytes ; *Br J Haematol*, 1985, 59, 171
44. Kitzis A, Brizard F, Dascalescu C et al: Persistence of transcriptionally silent BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia patients in sustained complete cytogenetic remission ; *Leuk Lymphoma* 2001, 42, 933-944
45. Koegler G, Wolf HH, Heyll A, Arkesteijn G, Wernet P: Detection of mixed chimerism and leukemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation in subpopulations of leukocytes by fluorescence in situ hybridization in combination with the simultaneous immunophenotypic analysis of interphase cells ; *Bone Marrow Transplant*, 1995, 15, 41-48
46. Koh LP, Hwang WY, Tan CH: Long term follow up of asian patients with chronic myeloid leukemia (CML) receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from HLA identical sibling-evaluation of risks and benefits; *Ann Hematol* 2004, 83, 286-294

47. Lawler M, Humphries P, McCann SR: Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction ; Blood 1991, 77, 2504-2514
48. Lazzarino M, Morra E, Castello A et al: Myelofibrosis in chronic granulocytic leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance ; Br J Haematol 1986, 64, 227-240
49. Levene RB, Williams NT, Lamaziere JM, Rabellino EM: Human megakaryocytes IV. Growth and characterization of clonable megakaryocyte progenitors in agar; Exp Hematol 1987, 15, 181
50. Levine RF: Isolation and characterization of normal human megakaryocytes; Br J Haematol 1980, 45, 487
51. Levine RF, Hazzard KC, Lamberg JD: The significance of megakaryocyte size ; Blood 1982, 60, 1122-1131
52. Mackinnon S, Barnett L, Bourhis JH et al: Myeloid and lymphoid chimerism after T – cell – depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA ; Blood 1992, 80, 3235-3241
53. Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly RJ: Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia ; Blood, 1994, 83, 3409-3416
54. Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH: Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft – versus – leukemia responses from graft – versus – host disease; Blood 1995, 86, 1261-1268
55. Martens UM, Waller CF, Lange W, Finke J: Quantitative analysis of mixed chimerism following allogeneic bone marrow transplantation using telomere flow – FISH ; Ann Hematol 2003, 82, 416-422
56. Martin PJ, Najfeld V, Hansen JA et al: Involvement of the B-lymphoid system in chronic myelogenous leukemia ; Nature 1980, 287, 49-50
57. Mason DY, Erber WN, Falini B, Stein H, Gatter KC: Immunoenzymatic labelling of haematological samples with monoclonal antibodies; In:

- Beverly P.C.L. (ed.), methods in haematology: monoclonal antibodies. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1986, pp 145
58. Mazur EM: Megakaryocytopoiesis and platelet production: a review ; *Exp Hematol* 15, 340, 1987
 59. Mazur EM, Hoffman R, Chasis J, Marchesi S, Bruno E: Immunofluorescent identification of human megakaryocyte colonies using an antiplatelet glycoprotein antiserum ; *Blood* 1981, 57, 277
 60. McGlave P: Bone marrow transplants in chronic myelogenous leukemia: an overview of determinants of survival; *Semin Hematol* 1990, 27, 23-30
 61. Messner HA, Jamal N, Izaguirre C: The growth of large megakaryocyte colonies from human bone marrow ; *J Cell Physiol Suppl* 1982, 1, 45
 62. Metcalf D, McDonald HR, Odartchenko N, Sordat B: Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro ; *Proc Natl Acad Sci* 1975, 72, 1744
 63. Miyamura K, Barret AJ, Kodera Y, Saito H: Minimal residual disease after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect: a review of recent results; *Bone Marrow Transplant* 1994, 14, 201-209
 64. Nakeff A, Daniels-McQueen S: In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M) ; *Proc Soc Exp Biol Med* 1976, 151, 587
 65. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, O'Reilly RJ, Chaganti RSK: Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation; *Blood*, 1990, 75, 1346-1355
 66. Palka G, Stuppia L, Bartolomeo D, Morizio E, Peila R, Franchi PG, Calabrese G: FISH detection of mixed chimerism in 33 patients submitted to bone marrow transplantation; *Bone Marrow Transplant*, 1996, 17, 231-236
 67. Peggs K, Mackinnon S: Imatinib mesylate – the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia; *N Engl J Med* 2003, 348, 1048-1050
 68. Podolak-Dawidziak M: Human megakaryocytopoiesis – normal and abnormal ; *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 1990, 117, 237

69. Przepiorka D, Gonzales-Chambers R, Winkelstein A, Rosenfeld C, Shadduck RK: Chimerism studies using in situ hybridization and karyotype analysis; Bone marrow Transplant 1990, 5, 253-257
70. Rabellino EM, Nachman RL, Williams N, Winchester RJ, Ross GD: Human megakaryocytes. I. Characterization of the membrane and cytoplasmic components of isolated marrow megakaryocytes ; J Exp Med 1979, 149, 1273
71. Rabellino EM, Levene RB, Leung LL, Nachman RL: Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes ; J Exp Med 1981, 154, 88
72. Radich JP, Gehly G, Gooley T, Bryant E, Clift RA, Collins S, Edmands S, Kirk J, Lee A, Kessler P, Schoch G, Buckner CD, Sullivan FR, Appelbaum FR, Thomas ED: Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Results and implications in 346 patients ; Blood 1995, 85, 2632-2638
73. Renner D, Propp H, Queisser W: Diploid and tetraploid precursors of megakaryocytes in normal human bone marrow detected by immunofluorescence ; Blut, 1987, 55, 459
74. Richards SM: Interferon – alpha: results from randomized trials; Baillieres Clin Haematol 1997, 10, 307-318
75. Roman J, Martin C, Torres A, Garcia A, Andres P, Garcia MJ, Baiget M: Importance of mixed chimerism to predict relapse in persistently BCR/ABL positive long survivors after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia; Leuk Lymphoma 1998, 28, 541-550
76. Rondon G, Giralt S, Pereira M et al: Analysis of chimerism following allogeneic bone marrow transplantation by fluorescent-in situ hybridization ; Leuk Lymphoma 1997, 25, 463-467
77. Rousselet MC, Kerjean A, Guyetant S, Francois S, Saint-Andre JP, Ifrah N: Histopathology of bone marrow after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia ; Pathol Res Pract 1996, 192, 790-795

78. Roux E, Helg C, Chapuis B, Jeannet M, Roosnek E: Evolution of mixed chimerism after allogenic bone marrow transplantation as determined on granulocytes and mononuclear cells by the polymerase chain reaction ; *Blood* 1992, 79, 2775-2783
79. Roy DC, Tabtravahi R, Murray C, Dear K, Gorgone B, Anderson KC, Freedman AS, Nadler LM, Ritz J: Natural history of mixed chimerism bone marrow transplantation with CD6-depleted allogenic marrow: a stable equilibrium; *Blood* 1990, 75, 296-304
80. Savage DG, Goldman JM: Approaches to the treatment of chronic myeloid leukemia ; *Int J Hematol* 1994, 60, 1
81. Sawyers CL.: Chronic myeloid leukemia ; *N Engl J Med* 1999, 340 (17)
82. Seong CM, Giralt S, Kantarjian H et al: Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia ; *J Clin Oncol* 2000, 18, 1831-1836
83. Serrano J, Roman J, Sanchez J, Jimenez A, Castillejo JA, Herrera c, Gonzalez MG, Reina L, Rodriguez MC, Alvarez MA, Maldonado J, Torres A: Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210 (BCR-ABL) and p190 (BCR-ABL) after allogenic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: Increasing mixed myeloid chimerism and p190 (BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse ; *Blood* 2000, 95, 2659-2665
84. Smith A, Robson LG, Sharma P, Shaw PJ: Application of interphase FISH on direct bone marrow smears for evidence of chimerism in pediatric sex mismatched bone marrow transplantation; *Pathology* 1999, 31, 25-28
85. Soiffer RJ, Murray C, Mauch P: Prevention of graft – versus – host disease by selective depletion of CD6+ T- lymphocytes from donor bone marrow; *J Clin Oncol* 1992, 10, 1191-1200
86. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V et al: Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia ; *N Engl J Med* 1986, 314, 729

87. Stuppia L, Calabrese G, Guanciali Franchi P, Di Bartolomeo P, Antonucci A, Peila R, Torlontano G, Palka G: Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in patients with different hematologic diseases treated by bone marrow transplantation ; *Cancer Genet Cytogenet* 1993, 65, 88-92
88. Tabilio A, Vainchenker W, van Haecke D, Vinci G, Guichard J, Henri A, Reyes F, Breton-Gorius J: Immunological characterization of the leukemic megakaryocytic line at light and electron microscope levels ; *Leuk Res* 1984, 8, 769
89. Talpaz M, Kantarjian HM, Kurzrock R: Interferon – alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome – positive patients; *Ann Intern Med* 1991, 114, 532-538
90. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K: Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia; *N Engl J Med* 1986, 314, 1065-1069
91. Tamura S, Saheki K, Takatsuka H, Wada H, Fujimori Y, Okamoto T, Takemoto Y, Hashimoto – Tamaoki T, Furuyama J, Kakishita E: Early detection of relapse and evaluation of treatment for mixed chimerism using fluorescence in situ hybridization following allogeneic 1330 – 1340 hematopoietic cell transplant for hematological malignancies ; *Ann Hematol* 2000, 79, 622-626
92. Thiagarajan P, Shapiro SS, Levine E, De Marco L, Yalcin A: A monoclonal antibody to human platelet glycoprotein IIIa detects a related protein in cultured human endothelial cells ; *J Clin Invest*, 1985, 75, 896
93. Thiele J, Bartsch HP, Kracht LW, Anwander T, Zimmer JD, Kreipe H, Fischer R: Ki-S1 and PCNA expression in erythroid precursors and megakaryocytes – a comparative study on proliferative and endoreduplicative activity in reactive and neoplastic bone marrow lesions; *J Pathol* 1994, 173, 5-12
94. Thiele J, Fischer R: Megakaryocytopoiesis in haematological disorders: diagnostic features of bone marrow biopsies. An overview. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1991, 418, 87

95. Thiele J, Fischer R: Prognostic implications of bone marrow features in chronic myelogenous leukemia; *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992, 421, 367
96. Thiele J, Fohlmeister I, Vonneguth B, Zankovich R, Fischer R: The prognostic implication of clinical and histological features in Ph⁺ chronic myelocytic leukemia (CML); *Anticancer Res* 1986, 6, 1401
97. Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, Leder LD, Schaefer UW: Bone marrow engraftment: Histopathology of hematopoietic reconstitution following allogenic transplantation in CML patients; *Histol Histopathol* 2001, 16, 213-226
98. Thiele J, Kvasnicka HM, Fischer R: Bone marrow histopathology in chronic myelogenous leukemia (CML) – evaluation in distinctive features with clinical impact; *Histol Histopathol* 1999, 14, 1241-1256
99. Thiele J, Quitmann H, Wagner S, Fischer R: Dysmegakaryopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS): an immunomorphometric study of bone marrow trephine biopsy specimens; *J Clin Pathol* 1991b, 44, 300
100. Thiele J, Titius BR, Kopsidis C, Fischer R: Atypical micromegakaryocytes, promegakaryoblasts and megakaryoblasts: a critical evaluation by immunohistochemistry, cytochemistry and morphometry of bone marrow trephines in chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes; *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992b, 62, 275
101. Thiele J, Vonneguth B, Fohlmeister I, Zankovich R, Fischer R: Philadelphia-Chromosom-positive chronische myeloische Leukämie (CML), ein Vergleich von Histopathologie des Knochenmarks mit klinischen Befunden; *Verh Dtsch Path* 1985, 69, 558
102. Thiele J, Wagner S, Dienemann D, Wienhold S, Fischer R, Stein H: Megakaryocyte precursors (promegakaryoblasts and megakaryoblasts) in the normal human bone marrow. An immunohistochemical and morphometric study on routinely processed trephine biopsies ; *Anal Quant Cytol Histol* 1990a, 12, 285-289
103. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Kleppe S, Beelen DW, Schaefer UW: Mixed chimerism of bone marrow CD34⁺ progenitor cells (genotyping, bcr/abl analysis) after allogenic transplantation for chronic myelogenous leukemia ; *Transplantation* 2002, 74, 982-986

104. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Beelen DW, Schaefer UW: Dynamics of lineage-restricted mixed chimerism following sex-mismatched allogenic bone marrow transplantation; *Histol Histopathol* 2003, 18, 557-574
105. Thiele J, Wienhold S, Zankovich R, Fischer R: a histomorphometric analysis of trephine biopsies of bone marrow from 65 patients with chronic myeloid leukemia. Classification of patients into subgroups with different survival patterns; *Anal Quant Cytol Histol* 1990c, 12, 103
106. Trensche R, Bernier M, Delforge A, Massy M, Lebeau de Hemricourt E, Maerevoet M, Badjou R, Stryckmans P, Bron D: Myeloid and lymphoid recovery following allogenic bone marrow and allogenic peripheral stem cell transplantation ; *Leuk Lymphoma* 1998, 30, 325
107. van den Berg H, Kluin PM, Vossen JM: Early reconstitution of hematopoiesis after allogenic bone marrow transplantation: A prospective histopathological study of bone marrow biopsy specimens ; *J Clin Pathol* 1990, 43, 365-369
108. van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, Devergie A, Frassoni F, Arcese W, de Witte T, Kolb HJ, Niederwiser D, Jacobsen N, Gahrton G, Bandini G, Carreras E, Bacigalupo A, Michallet M, Ruutu T, Reiffers J, Goldman JM, Apperley J, Gratwohl A: Longterm results after allogenic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; *Bone Marrow Transplant*, 1997, 20, 553
109. Vainchenker W, Bouguet J, Guichard J, Breton-Gorius J: Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors ; *Blood* 1979a, 54, 940
110. Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, Guichard J, Titeux M, Breton-Gorius J, McMichael AJ: Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in in vivo cells from normal and leukemic patients; *Blood* 1982a, 59, 514

111. Vainchenker W, Guichard J, Deschamps JF, Bouget J, Titeux M, Chapman J, McMichael AJ, Breton-Gorius J: Megakaryocyte cultures in the chronic phase and in the blast crisis of chronic myeloid leukemia: studies on the differentiation of the megakaryocyte progenitors and on the maturation of megakaryocytes in vitro; *Br J Haematol* 1982b,51, 131
112. Vainchenker W, Guichard J, Breton-Gorius J: Growth of human megakaryocyte colonies in culture from fetal, neonatal and adult peripheral blood cells: ultrastructural analysis; *Blood Cells* 5, 25, 1979b
113. Vinci G, Tabilio A, Deschamps JF, Van Haeke D, Henri A, Vainchenker W: Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes ; *Br J Haematol*, 1984, 56, 589
114. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N: Antileukemic effect of chronic graft – versus – host disease: contribution to improved survival after allogeneic bone marrow transplantation; *N Engl J Med*, 1981, 304, 1529-1533
115. Wessman M, Popp S, Ruutu T et al: Detection of residual host cells after bone marrow transplantation using non-isotopic in situ hybridization and karyotype analysis ; *Bone Marrow Transplant* 1993, 11, 279-284
116. White AD, Sweeney MC: Detection of male cells in mixtures containing varying proportions of male and female cells by fluorescence in situ hybridization and G-banding; *Cytometry* 1993, 14, 9-15
117. Wickenhauser C, Thiele J, Perez F, Varus E, Stoffel MS, Kvasnicka HM, Beelen UW: Mixed chimerism of the resident macrophage population after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia ; *Transplantation* 2001, 73, 104-111
118. Wickenhauser C, Thiele J, Perez F: Mixed chimerism of the resident macrophage population after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia; *Transplantation* 2002, 73, 104-111
119. Williams N, Levine RF: The origin, development and regulation of megakaryocytes ; *Br J Haematol* 1982, 52, 173-180
120. Vainchenker W, Bouguet J, Guichard J, Breton - Gorius J: Megakaryocyte colony formation from human bone marrow precursors ; *Blood* 54, 940, 1979a

121. Vainchenker W, Deschamps JF, Bastin JM, Guichard J, Titeux M, Breton – Gorius J, McMichael AJ: Two monoclonal antiplatelet antibodies as markers of human megakaryocyte maturation: immunofluorescent staining and platelet peroxidase detection in megakaryocyte colonies and in vivo cells from normal and leukemic patients; *Blood* 1982b, 51, 131
122. Vainchenker W, Guichard J, Breton – Gorius J: Growth of human megakaryocyte colonies in culture from fetal, neonatal and adult peripheral blood cells: ultrastructural analysis; *Blood cells* 1979b, 5, 25
123. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasmanarski J, Ringden O: Mixed chimerism in the B-cell-lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia; *Bone Marrow Transplant* 2001, 27, 809-815

7 Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie die freundliche und verständnisvolle Betreuung möchte ich Herrn Prof. Dr. med. J. Thiele, emeritiertem Leiter der Sektion Hämatopathologie des Instituts für Pathologie der Universität zu Köln danken sowie Herrn Prof. Dr. med. H.P. Dienes, Direktor des Instituts für Pathologie der Universität zu Köln, für die Möglichkeit, die Dissertation am Zentrum für Pathologie der Universität Köln zu erstellen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. C. Wickenhauser für die Übernahme der Dissertation. Durch ihre ständige Motivation und ihr Engagement hat sie den entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Ebenso herzlich möchte ich Frau E. Varus für ihre immer freundliche und kompetente Unterstützung während des experimentellen Teils der Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich allen Ärzten der beteiligten Kliniken, die mit der Behandlung der Patienten dieser Dissertation betraut waren, danken. Insbesondere bin ich Herrn Professor Dr. med. U.W. Schäfer, Leiter der Klinik für Knochenmarkstransplantation der Universität Essen, sowie Herrn Professor Dr. med. N. Niederle, Chefarzt der med. Klinik des Städtischen Klinikums Leverkusen (vormals Westdeutsches Tumorforschungszentrum der Universität Essen) für die kontinuierliche Zusammenarbeit im Rahmen der Studie dankbar.

8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Schneider
Geburtsdatum: 07.09.1976
Geburtsort: Hamburg
Eltern: Ulla Schneider, selbständige Künstlerin
Baldur Schneider, Diplom Volkswirt
Nationalität: Deutsch

Schul Ausbildung

1983 – 1987 Grundschule Klosterbergen Reinbek
1987 – 1996 Sachsenwaldgymnasium Reinbek
1996 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

SS `98 – SS `00 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
WS `00 – WS `04 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Köln
04/2000 Ärztliche Vorprüfung
04/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

Seit 02/2005 Assistenzärztin,
Klinik für Hals – Nasen – Ohrenheilkunde,
St. Elisabeth – Krankenhaus Köln – Hohenlind
Seit 07/2010 Oberärztin
Klinik für Hals – Nasen – Ohrenheilkunde,
St. Elisabeth – Krankenhaus Köln – Hohenlind